

***Histologische und zellbiologische Analytik von Gelenkknorpel bei
Osteochondrosis dissecans und Traumen bei der autologen
Knorpelzelltransplantation***

Dissertation
zur Erlangung des akademischen Grades

doctor medicinae

(Dr. med.)

vorgelegt dem Rat der Medizinischen Fakultät
der Friedrich-Schiller-Universität Jena

von Mandy Seifert

geboren am 02.07.1979 in Schmalkalden

Gutachter:

1. Prof. Dr. med. R. Venbrocks
2. Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. G.O. Hoffmann
3. Prof. Dr. med. Irlenbusch

Tag der öffentlichen Verteidigung: 05.12.2006

In Erinnerung an Eva

Ideale sind wie Sterne.
Wir erreichen sie niemals,
aber wie die Seefahrer auf dem Meer
richten wir unseren Kurs nach ihnen.

Carl Schurz

1. Abkürzungen

a.d.	destilliertes Wasser (aqua dest)
aa	Aminosäuren
Abb.	Abbildung
ACT	Autologe Chondrozytentransplantation
AIF	Antiinvasionsfaktor
AP	Alkalische Phosphatase
bFGF	basic Fibroblast Growth Factor
BMP	Bone Morphogenetic Protein
BMI	Body Mass Index
bo	bovin
bp	Basenpaare
cDNA	Copy-DNA
COX- 2	Cyclooxygenase- 2
DEI	Diffraction Enhanced Imaging
DGU/DGOOC	Deutsche Gesellschaft für Unfallchirurgie/ Deutsche Gesellschaft für Orthopädie und orthopädische Chirurgie
DNA	Desoxyribonucleinsäure
EthBr	Ethidium- Bromid
EGF	Epidermal Growth Factor
EDTA	Ethylendiamidtetraessigsäure
EZM	Extrazelluläre Matrix
FC	Femurcondylus
GAPDH	Glycerinaldehyd- 3- phosphat- dehydrogenase
HE	Hämatoxylin- Eosin
hu	human
IHC	Immunhistochemie
ID	Identität
IGF- I	Insulin like growth factor- I
IL	Interleukin
ICRS	International Cartilage Repair Society
KCl	Kaliumchlorid

kDa	Kilodalton
lat.	lateral
li.	links
MAPK	mitogen activated protein kinase
med.	medial
min.	Minuten
MMP	Matrixmetalloproteasen
mRNA	Messenger- RNA
mou	mouse
MRT	Magnetresonanztomographie
NaCl	Natriumchlorid
NBT	Nitroblautetrazoliumchlorid
OCD	Osteochondrosis dissecans, Osteochondritis dissecans
OCT	osteochondrale Transplantation
OA	Osteoarthritis
OP	Osteogenic Protein
PBS	Phosphatgepufferte Saline
PCR	Polymerase Chain Reaction
RT	Reverse Transkription
ra	rabbit
re.	rechts
sec.	Sekunden
SO	Safranin- O
WHO	World Health Organization
ZK	Zellkultur

1.1. Verwendete Einheiten

cm	Zentimeter
g	Gramm
l	Liter
h	Stunden
min	Minuten
sec	Sekunden
rpm	Umdrehungen pro Minute
x g	Erdbeschleunigung
U	Unit (Enzymeinheit)
A	Ampère
V	Volt

1.2. Präfixe

k	kilo
m	milli
μ	mikro
n	nano
p	piko

2. Inhaltsverzeichnis

1. Abkürzungen	I 1
1.1. verwendete Einheiten	I 3
1.2. Präfixe	I 3
2. Inhaltsverzeichnis	II 1
3. Zusammenfassung	1
4. Einleitung	3
4.1. Problematik und Ziele der Arbeit	3
4.2. Gelenkknorpel	4
4.2.1. Differenzierung von Zellen des Binde- und Stützgewebes	4
4.2.2. Aufbau und Funktion des Gelenkknorpels	4
4.2.3. Extrazelluläre Matrix	7
4.2.3.1. Kollagene	8
4.2.3.1.1. Kollagen Typ II	9
4.2.3.1.2. Kollagen Typ I	10
4.2.3.1.3. Kollagen Typ X	10
4.2.4. Glykane	10
4.2.4.1. Proteoglykan	10
4.2.4.2. Aggrecan	11
4.2.5. Wachstumsfaktoren	12
4.2.5.1. Bone Morphogenetic Protein- 7 (BMP-7)	12
4.2.5.2. Basic Fibroblast Factor (bFGF)	13
4.2.5.3. Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF)	14
4.2.5.4. Transforming Growth Factor- β (TGF- β)	15
4.2.6. Zytokin: Interleukin- I (IL-1)	16
4.2.7. Knorpelstoffwechsel	16
4.3. Osteoarthritis (OA)	17
4.3.1. Pathogenese	19
4.4. Osteochondritis dissecans (OCD)	21
4.4.1. Definition	21
4.4.2. Ätiologie	21
4.4.3. Lokalisationen	22
4.4.4. Pathogenese/ Epidemiologie	22

4.4.5. Klinik	24
4.4.6. Apparative Diagnostik	24
4.4.7. Arthroskopie	25
4.4.8. Differentialdiagnosen	27
4.4.9. Therapie und Prognose	27
4.4.10. Verfahren der Knorpelreparatur	28
4.4.10.1. Transplantation	28
4.4.10.2. Autologe Chondrozyten Transplantation (ACT)	28
4.5. Qualitätssicherung von ACT und Tissue Engineering	31
5. Materialien	32
5.1. Geräte	32
5.2. Chemikalien	33
5.3. Enzyme	33
5.4. Färbungen	34
5.5. Antikörper	34
5.6. Test Kits	35
5.7. Primer	35
5.8. Verbrauchsmaterialien	35
5.9. Computer Software	36
5.10. Patientendaten	36
6. Methoden	38
6.1. Diagnostik	38
6.1.1. MRT	38
6.1.2. Arthroskopie	38
6.2. Entnahme von Knorpel und Verarbeitung artikulärer Chondrozyten	38
6.2.1. Isolation der Chondrozyten	39
6.3. Zellkultur	39
6.4. Zellzählung	40
6.5. Reimplantation	40
6.6. Molekularbiologie	41
6.6.1. Herstellung von Puffern und Lösungen	41
6.6.2. PCR	42
6.6.2.1. RNA- Extraktion	42
6.6.2.2. Reverse Transkription	43

6.6.2.3.	RT- PCR	43
6.6.2.4.	Gelelektrophorese	44
6.6.2.5.	Photographie und Auswertung der Gelbilder	45
6.6.2.6.	Vergleich semiquantitative und quantitative PCR	46
6.7.	Histologie	46
6.7.1.	Gefrierschnitte	46
6.7.2.	Paraffinschnitte	47
6.7.3.	Puffer und Lösungen	47
6.7.4.	Färbungen	48
6.7.4.1.	Hämatoxylin- Eosin	48
6.7.4.2.	Safranin- O/ Lichtgrün	48
6.7.4.3.	Masson- Goldner	48
6.7.5.	Immunhistochemie	49
6.7.5.1.	Alkalische Phosphatase	49
6.7.5.2.	Kollagen Typ I, II, X	49
6.7.6.	Auswertung der Histologien	50
6.8.	Auswertung der Krankenakten	52
7.	Ergebnisse	53
7.1.	Auswertung der Patientendaten	53
7.2.	Auswertung der Histologie und Immunhistochemie	54
7.2.1.	Darstellung ausgewählter Histologien von Dissekat und Flake	56
7.2.1.1.	Gegenüberstellung von Dissekat EM84 und Dissekat HS75	56
7.2.1.2.	Gegenüberstellung von Flake HS73 und Flake PH60	57
7.2.1.3.	Gegenüberstellung von Dissekat HS81 und Dissekat BP87	59
7.2.1.4.	Darstellung des Dissekates RJ57	60
7.2.1.5.	Darstellung des Dissekates ML57	62
7.2.2.	Darstellung ausgewählter Histologien von Defekt, Defektrand und Mausbett	63
7.2.2.1.	Gegenüberstellung von Mausbett KU47 und Defektrand DM73	63
7.2.2.2.	Gegenüberstellung der Knorpelknochenstücke des Defektes BF85-1 und des Mausbettes EM84	65
7.2.2.3.	Darstellung des Defektes BJ79	68
7.2.2.4.	Gegenüberstellung von Notch ML57 und Notch EM84	69

7.2.3. Zusammenfassung	71
7.3. Auswertung der RT- PCR	71
7.3.1. Synopsis	72
7.3.2. Vergleich innerhalb der Kollektive	74
7.3.2.1. Trauma- Notch vs. OCD- Notch	74
7.3.2.2. Dissekat vs. Flake	75
7.3.2.3. OCD- Notch vs. Dissekat	75
7.3.2.4. Trauma- Notch vs. Flake	76
7.3.2.5. Trauma- Notch vs. Defekt	76
7.3.3. Darstellung ausgewählter Einzelproben	77
7.3.3.1. OCD- Einzeldarstellungen	77
7.3.3.1.1. BP87 OCD- Notch und Dissekat	77
7.3.3.1.2. GT68 OCD- Notch und Dissekat	78
7.3.3.1.3. HS81 OCD- Notch und Dissekat	79
7.3.4.1. Trauma- Einzeldarstellungen	80
7.3.4.1.1. BJ79 Trauma- Notch und Defekt	80
7.3.4.1.2. DM73 Trauma- Notch und Defekt	81
7.4. Vergleich von Histologie/ Immunhistochemie und RT- PCR	82
7.4.1. BJ79 Defekt- Eingang	82
7.4.2. DM73 Defekt- Eingang	83
7.4.3. HS73 Flake- Eingang und EM84 Dissekat- Eingang	83
7.4.4. HS75 Dissekat- Eingang	84
7.4.5. EM84 Notch- Eingang	84
7.5. Auswertung der Zellkultur	85
8. Diskussion	86
9. Schlussfolgerung	95
10. Literaturverzeichnis	96
11. Anhang	107
11.1. Ehrenwörtliche Erklärung	107
11.2. Lebenslauf	108
11.3. Danksagung	109

3. Zusammenfassung

Einführung

Die Ätiologie der OCD (Osteochondrosis dissecans) ist bisher nicht geklärt. Sie ist eine Form der aseptischen Knochennekrose und führt zu freien Gelenkkörpern.

Ziel dieser Arbeit ist die histologische und molekularbiologische Analyse von humanen Knorpelfragmenten, die aus traumatisch geschädigten und aus OCD betroffenen Gelenken stammen und deren Vergleich jeweils mit Proben gesunden Knorpels aus denselben Gelenken.

Material und Methoden

Knorpelfragmente von Patienten mit OCD und Traumata wurden arthroskopisch entfernt und analysiert. Histologisch und immunhistochemisch (Kollagen Typ I, II, X, Alkalische Phosphatase) wurden insgesamt 40 Präparate in HE-, Safranin- O- und Masson- Goldner-Färbung untersucht und mittels einer erweiterten Variante der Mankin- Skala ausgewertet, die die Erfassung der Alkalischen Phosphatase Aktivität, und die Immunhistologie für Kollagen Typ I, II und X beinhaltet. Es wurde mittels mRNA aus isolierten Chondrozyten Kollagen Typ I, II, X, Aggrecan, TGF- β , BMP- 7, bFGF, VEGF und IL- 1 Expression analysiert. Zur Untersuchung der Vitalität sind die Chondrozyten 14 Tage nachkultiviert worden sowie die Zellproliferation und die Genexpression derselben Gene gemessen.

Ergebnisse

1. Sowohl histologisch als auch zellbiologisch präsentierte sich ein sehr heterogenes Bild von Gelenkknorpel.
2. Bedeutende Unterschiede stellten sich zwischen OCD und Trauma nicht heraus. Die molekularbiologischen Analysen zeigen eine Desorganisation der Knorpelhomöostase in einem Mosaik von gesundem, hypertrophem und dedifferenziertem Knorpel. In den histologischen Präparaten fanden sich arthritische Veränderungen aller Stadien.
3. Die hohe Vitalität der Chondrozyten stellte sich mit über 90% sowohl vor als auch nach der Zellkultur dar. Sogar makroskopisch qualitativ schlechtere Knorpelfragmente wiesen eine hohe Vitalität und ein enormes Potential der Proliferation auf, so dass die intrinsische Reparaturkapazität von Knorpelzellen veranschaulicht werden konnte.

Diskussion

Die enorme Variabilität von Gelenkknorpel und arthritisch- degenerativen Veränderungen zeigen sich in beiden Kollektiven. Die Abgrenzung der OCD zur Osteoarthrose ist schwer da geschädigter Knorpel grundsätzlich dem Prozess der Arthrose unterliegt. Fokale Expressionsunterschiede innerhalb der Knorpelschichten sind aufgrund der schichtunspezifischen Analyse nur in ihrer Gesamtheit zu bewerten.

Schlussfolgerungen

In weiteren Studien wird die Ätiologie der OCD zu klären sein, insbesondere die Abgrenzung der Pathomechanismen im Knorpel zur OA. Besonders hervorzuheben ist die Tatsache, dass die Ergebnisse ferner auf eine außerordentlich hohe biologische Qualität und ein hohes Proliferationspotential der Knorpelzellen aus den Dissekaten hinweisen, so dass sie unter Umständen für die Therapie der OCD bei der autologen Knorpeltransplantation (ACT) herangezogen werden können.

4. Einleitung

4.1. Problematik und Ziele der Arbeit

Die Osteochondrosis dissecans ist eine Krankheit, die den subchondralen Knochen bis zur Knorpeloberfläche betrifft und zu freien Gelenkkörpern mit verbleibendem Mausebett führt. Obwohl diese Krankheit erstmals vor mehr als 100 Jahren beschrieben wurde, werden verschiedene Theorien über die Ätiologie vermutet (Schenck et al. 1996, Bruns 1996). Scheinbar ist dieser Prozess multifaktoriell und am ehesten traumatischer Genese (Bruns 1996, Ribbing 1955). Daher fehlt eine kausale Therapie. Vielmehr stehen die Vermeidung der Progression der Krankheit mit der Induktion einer Arthrose, der Erhalt des Knorpels und die Rekonstruktion der Knorpelschicht im Vordergrund. Besonderheiten von hyalinem Gelenkknorpel sind das Fehlen von Nerven, Blut- und Lymphgefäßen, dessen geringer Anteil von Zellen und deren postmitotischer Zustand (Bruns und Steinhagen 2000). Intrinsische Reparaturmechanismen sind zwar vorhanden, führen aber nicht zu einer restitutio ad integrum (Mollenhauer und Aurich 2003, Bruns und Steinhagen 2000) und zeigen abhängig vom Gelenk verschiedene Reparaturkapazitäten (Kuettner und Cole 2005) und differierende Metabolismusraten (Aurich et al. 2005). Zahlreiche Methoden zur Regeneration bzw. Reparatur des Gelenkknorpels sind entwickelt worden, die aber bis heute den hohen Anforderungen von hyalinem Knorpelgewebe auf Dauer nicht genügen (Mollenhauer und Aurich 2003, Nagura 1960).

Die Grundlagenforschung beschäftigt sich intensiv mit dem Stoffwechsel von Chondrozyten, Gelenkknorpel und den Veränderungen bei der Osteoarthrose. Wenig bekannt sind die histologische und molekularbiologische Qualität sowie das zellbiologische Potential disseziierter oder traumatisch gelöster Knorpelstücke der Mausebitten oder der Defekte. Weitestgehend unbekannt ist der Knorpelmetabolismus bei der OCD. Die Kenntnisse auf diesem Gebiet könnten zu einem besseren Verständnis der Pathogenese, Ätiologie und der Knorpelreparatur auf molekularbiologischer und histologischer Ebene führen. Der Knorpelschaden bei Osteochondrosis dissecans wird als präarthrotische Deformität eingestuft (Bruns und Steinhagen 2000, Puhl 1974). Schwierig gestaltet sich die Trennung primärer Abnormitäten wie bei der OCD bisher angenommen, von Einflüssen, die sekundär auf geschädigten Knorpel einwirken (Guthrie et al. 1992). Pathogenetisch werden je nach Epiphysenstatus die juvenile und adulte Verlaufsform unterschieden, die auch hinsichtlich der Arthroseprogression und der Therapiebedürftigkeit

differieren (Green und Banks 1953, Cahill 1995). Vor allem bei Erwachsenen ist eine Arthrose nicht sicher vermeidbar. Da die Arthrose die häufigste chronische Gelenkerkrankung ist und in Deutschland 19 Millionen Menschen betrifft (www.dgk.de), besitzt sie sozialmedizinisch einen hohen Stellenwert, denn die steigende Lebenserwartung in den Industrieländern bedeutet eine Zunahme der Arthrose mit enormen Behandlungs- und Folgekosten.

Ziel dieser Arbeit ist die Gegenüberstellung molekularbiologischer und histologischer Merkmale von Gelenkknorpel mit OCD und Traumata, um ein besseres Verständnis von der Qualität der Chondrozyten sowie dem Knorpelmetabolismus dieser geschädigten Gelenke zu erlangen um damit mögliche Unterschiede in der Ätiopathogenese formulieren zu können. Diese Arbeit soll einen Teil dazu beitragen, das Potential von Chondrozyten, den Knorpelstoffwechsel, die Regeneration und die Ätiologie zu verstehen, um die Entwicklung kausaler Therapien zu fördern oder vorhandene Verfahren wie z.B. die ACT, die sowohl bei der OCD als auch bei traumatischen Knorpelschäden angewendet wird, zu verbessern.

4.2. Gelenkknorpel

4.2.1. Differenzierung von Zellen des Binde- und Stützgewebes

Binde- und Stützgewebszellen entwickeln sich aus dem Mesenchym, welches embryonal aus dem Mesoderm hervorgeht. Mesenchymale Vorläuferzellen differenzieren sich zu vielfältigen Zellarten wie Fibroblasten, Chondrozyten, Osteoblasten und Myoblasten, die untereinander eng in Verbindung stehen (Moore und Persaud 1996, Zaleske 1997). Ihre Metaplasie wird im postmitotischen Zustand und in vivo diskutiert und spielt bei der Entwicklung und Differenzierung z.B. in der Wachstumsfuge eine große Rolle (Weisser et al. 2002). Knorpelzellen können sich in fibroblastenähnliche (Benya et al. 1978) und hypertrophe Knorpelzellen differenzieren (Weisser et al. 2002).

4.2.2. Aufbau und Funktion des Gelenkknorpels

Knorpel wird dem Binde- und Stützgewebe zugeordnet. Er besteht aus den Knorpelzellen (Chondrozyten) und seiner speziellen extrazellulären Matrix (EZM). Der Zellanteil ist mit ca. 5% am Gesamtvolumen relativ gering (Mollenhauer und Kuettner 1997, Bruns und

Steinhagen 2000, Martinek 2003, Kuettner 1994). Knorpel ist ein bradytrophes Gewebe, welches keine Blutgefäße, Nerven und Lymphgefäße enthält und somit eine besondere Stoffwechselsituation besitzt (Bruns und Steinhagen 2000). Einwirkende Kräfte werden im gesunden Knorpel gleichmäßig verteilt, so dass übermäßige Belastungen vermieden werden. Hierfür sind eine einzigartige Kombination aus Elastizität und Steifheit sowie ein geringer Reibungskoeffizient notwendig (Bruns und Steinhagen 2000, Martinek 2003). Der Gelenkknorpel (Abb.1) ist in vier Schichten einzuteilen, die fließend ineinander übergehen (Mollenhauer und Kuettner 1997, Kuettner 1994). Die Anordnung der Knorpelzellen, Größe, Form und metabolische Aktivität sind in den Zonen des hyalinen Knorpels unterschiedlich und abhängig von den einwirkenden Kräften (Bruns und Steinhagen 2000, Martinek 2003, Kuettner 1994).

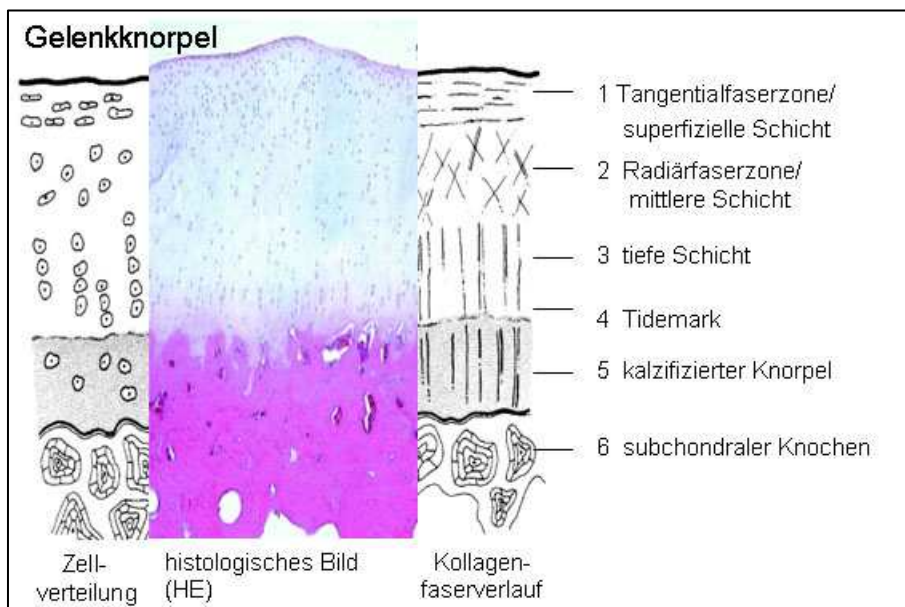


Abb. 1:
Morphologie des
Gelenkknorpels
entnommen und
modifiziert aus
Martinek 2003

Die superfizielle Schicht oder auch Tangentialfaserzone ist die zell dichteste Zone und beträgt 10-20% des Gesamtvolumens. In mehreren Schichten parallel zur Knorpeloberfläche liegend befinden sich flache Chondrozyten (Martinek 2003). Die Kollagene sind tangential angeordnet und sorgen für die größte Fasersteifigkeit und eine gleichmäßige Gewichtsverteilung. Ein Perichondrium- Äquivalent als Grenzsicht zwischen Knorpelgewebe und Synovia kann als zellfreie, fibrilläre Lamina splendens aufgelagert sein (Mollenhauer und Kuettner 1997). Die mittlere Schicht, definiert als Übergangszone oder auch Radiärzone, beinhaltet mit ca. 40-60% der Knorpeldicke mehr sphärische Chondrozyten, die in kleinen, isogenen Gruppen angeordnet sind und mehr Proteoglykan bilden. Die Kollagenfibrillen sind am dicksten und der Wassergehalt am geringsten.

Produziert werden vor allem in den tieferen Schichten alle Komponenten der extrazellulären Matrix (Mollenhauer und Kuettner 1997).

In der tiefen Schicht, die ca. 30% der Knorpeldicke einnimmt, sind die Knorpelzellen ellipsoid und radial in Säulen mit 2-6 Zellen angeordnet. Der Verlauf der Kollagenfasern ist ebenfalls senkrecht und zieht durch die Tidemark in den subchondralen Knochen (Martinek 2003). Eine zellfreie Linie von 10µm Dicke, die die Grenze zwischen dem nichtkalzifizierten und dem kalzifizierten Knorpel bildet, ist die Tidemark. Im Prozess des Alterns zeigt die Tidemark nach oben hin Ausbreitungstendenzen. Die vierte Schicht stellt den kalzifizierten Knorpel mit noch weniger Zellen als in der tiefen Zone dar. Perizellulär befindet sich nichtkalzifizierte Matrix, die Interterritorien sind dagegen kalzifiziert (Kuettner 1994).

Die Verzahnung von kalzifizierendem und nichtkalzifizierendem Knorpel und der Faserverlauf der Kollagene zum subchondralen Knochen wirken stabilisierend. Unterhalb der letzten Knorpelschicht schließt sich als Schnittstelle zum Knochen der subchondrale Knochen an (Mollenhauer und Kuettner 1997).

Innerhalb des adulten Knorpels können drei Kompartimente (Abb. 2) charakterisiert werden. Die verhältnismäßige Größe schwankt individuell, ja sogar innerhalb des gleichen Knorpels (Kuettner 1994). Jeder einzelne, hochdifferenzierte Chondrozyt wird als funktionelle Einheit betrachtet. Er produziert seine eigene perizelluläre Matrix, den sogenannten Knorpelhof und wird über Mikrofilamente z.B. Anchorin mit der perizellulären Matrix verbunden.

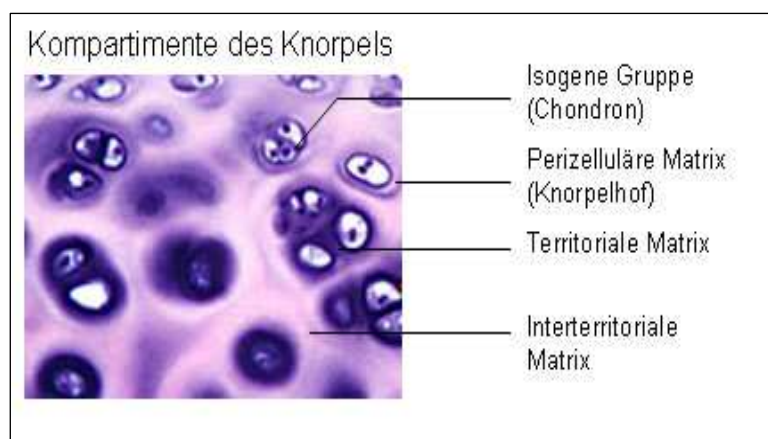


Abb.2 :
Kompartimente des Knorpels

Hohe Konzentrationen an Proteoglykanen und Hyaluronsäuren sowie die Abwesenheit von organisierenden Kollagenfibrillen kennzeichnen diesen Bereich. Die Einzelzellen bzw. die isogenen Gruppen (Chondrone) werden von der territorialen Matrix umhüllt und stehen im

Kontrollbereich der Knorpelzellen (Junqueira und Caneiro 1996). Unterschiede zwischen der territorialen Matrix und der sie umgebenden interterritorialen Matrix sind sowohl strukturell als auch funktionell eindeutig (Mollenhauer und Kuettner 1997). Die sich radiär anschließende interterritoriale Matrix steht nicht mehr unter direkter metabolischer Kontrolle der Chondrozyten. Sie wird als inert bezeichnet. Hier sind die meisten Kollagenfilamente und Proteoglykane zu finden (Kuettner 1994). Fehlende Zell-Zell-Kontakte, Nerven, Blut- und Lymphgefäße erfordern einen Stoffaustausch, der allein auf die Diffusion beschränkt ist und nur durch die ausgeklügelte Mechanik des Gewebes durch Saug – Druckkräfte möglich ist (Mollenhauer und Kuettner 1997, Kuettner 1994). Elektronenmikroskopisch wird die Oberfläche von Chondrozyten durch kleine Einziehungen und Ausstülpungen vergrößert, die bei jungen Zellen verstärkt vorhanden sind. Die organellenreichen Chondrozyten besitzen viel rauhes Endoplasmatisches Retikulum (rER) und große Golgi – Komplexe. Dies zeigt eine hohe Stoffwechselaktivität in der Protein- und Kohlenhydratsynthese (Junqueira und Caneiro 1996). Hauptsächlich werden große Mengen an Proteoglykanen und Kollagen Typ II gebildet. Reife Chondrozyten lagern Glykogen und große Fetttropfen ein.

4.2.3. Extrazelluläre Matrix

Hauptbestandteile der Interzellularsubstanz (Abb.3) sind Wasser (65-80% des Feuchtgewichtes), Glykane (5-10% des Feuchtgewichtes), Kollagene (10-30% des Feuchtgewichtes) und Mineralien (Mollenhauer und Aurich 2003, Mollenhauer und Kuettner 1997, Junqueira und Caneiro 1996).

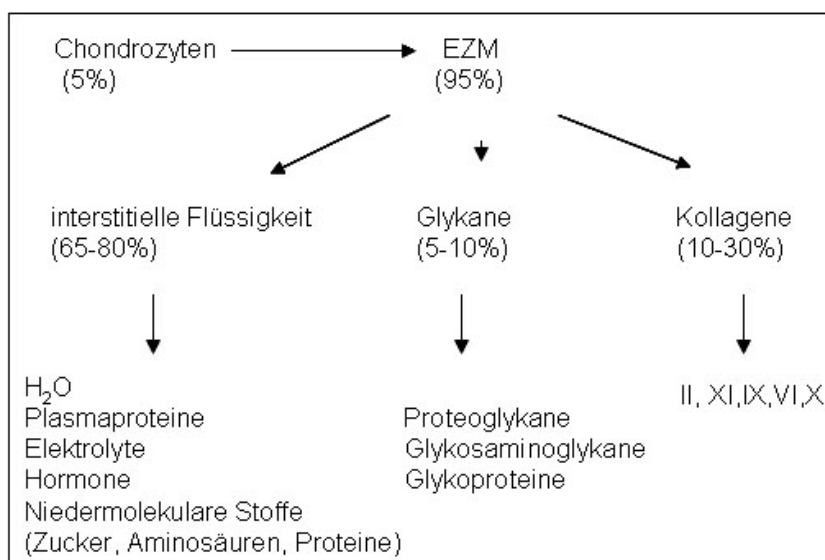


Abb. 3:
Biochemische
Zusammensetzung des
Gelenkknorpels
(Mollenhauer und Aurich
2003, Mollenhauer und
Kuettner 1997)

In Abhängigkeit der physiologischen Bedürfnisse, beispielsweise bei Änderungen der Belastung, wechselt deren Zusammensetzung (Kuettner 1994, Junqueira und Caneiro 1996).

4.2.3.1. Kollagene

Kollagene erzeugen als aufwändige Rahmenkonstruktion, mit der Bildung eines trajektoriellen Systems und eingebettet in die amorphe Grundsubstanz, die Struktur des Knorpels und verleihen ihm mechanische Festigkeit und Elastizität. Ausgehend vom subchondralen Knochen ziehen sie vertikal in Richtung Oberfläche, um an Stärke zuzunehmen, sowie unter der Oberfläche einen bogenförmigen Verlauf einzunehmen um dann zur Oberfläche parallel zu verlaufen (Abb. 1). Sie fangen dadurch Druck und Zugspannung auf, erhalten enorme Zugfestigkeit und sind druckelastisch (Junqueira und Caneiro 1996). Kollagen ist als Strukturprotein das häufigste tierische Protein überhaupt. Derzeit sind ca. 20 Kollagentypen (Tab.1) bekannt (von der Mark 1999), die wegen ihrer strukturellen Vielfalt verschiedene Einteilungen erfahren. Typisch für die Grundstruktur der Kollagene sind drei Helices mit der repetitiven Tripeptid-Sequenz Gly-X-Y, die sich in Form einer Tripelhelix verdrillen und als Tropokollagen bezeichnet werden. Dabei muss mindestens ein Teil des Moleküls aus drei Polypeptidketten bestehen, die identisch sein können. Glycin ist zu einem Drittel unter den Aminosäuren vertreten und stellt ein Charakteristikum der Kollagene unter den Proteinen wie auch der relativ hohe Gehalt an Prolin und Hydroxyprolin sowie das Vorkommen des Hydroxylysins dar. Während in den Haupttypen alle drei Ketten komplett verdrillt sind, werden in den Minoritäten- Kollagenen nur bestimmte Bereiche umeinander gewunden. Bündel aus Tropokollagenen bilden Mikrofibrillen, die sich zu Kollagenfibrillen und letztlich zu Kollagenfasern zusammensetzen. Kollagene können im rER als Vorstufen, den Pro- Kollagenen mit Amino- (NH₂-) und Carboxyl- (COOH-) Telozeptiden, synthetisiert und sezerniert werden. Das reife Kollagenmolekül entsteht durch extrazelluläre Abspaltung des Propeptides, welches sich dann selbst zu Kollagenfibrillen mit einem Durchmesser von 10-300 nm faltet (Löffler und Petrides 1998). Prozesse des alternativen Splicings und posttranslationale Regulation führen zur Modifikation der Kollagene während der Kollagenbiosynthese (von der Mark, 1999). Lichtmikroskopisch sind die Kollagenfibrillen von gesundem Knorpel nicht sichtbar, weil sie aufgrund des gleichen Brechungsindexes wie die Interzellularsubstanz maskiert sind. Mit einem Polarisations- oder Elektronenmikroskop werden die

Fibrillen sichtbar. Regressive Veränderungen während des Alterns können sogenannte Asbestfasern sichtbar werden lassen. Dies deutet auf einen Wasserverlust hin, der die Kollagenfasern zusammenlagert und sie schließlich demaskiert. In normalem Gelenkknorpel befinden sich die Kollagene II, XI, IX, VI und X (Tab. 1). Im Folgenden werden die Kollagene vom Typ I, II und X näher betrachtet.

4.2.3.1.1. Kollagen Typ II

Kollagen Typ II gehört zu den fibrillenbildenden Kollagenen (Tab.1) und stellt mit mehr als 90% Anteil am Kollagenvolumen das wichtigste Hauptkollagen des hyalinen Knorpels dar (Mollenhauer und Kuettner 1997). Mit den Kollagenen der Typen IX und XI bauen sich die typischen Kollagenfibrillen auf. Außerdem wird Kollagen Typ II als Hauptkollagen im Glaskörper des Auges, dem Nucleus pulposus des Wirbelkörpers sowie in embryogenen Epithelien nachgewiesen. Drei gleiche α_1 -Typ – II – Ketten ($[\alpha_1(\text{II})]_3$) winden sich in Form einer Tripelhelix umeinander. Kollagen Typ II besteht aus vielen Hydroxylysinmolekülen, die die Tropokollagenmoleküle der dünnen Fibrillen (Durchmesser 10- 20nm) untereinander verbinden und selbst Disaccharide binden können (Junqueira und Caneiro 1996). Chondrozyten exprimieren je nach Subtyp bzw. durch den Prozess des Splicings verschiedene Varianten des Kollagen Typ II. Reife Knorpelzellen produzieren die typischen Kollagen Typen IIB (COL-2B), IX und XI sowie Aggrecan und Link Proteine, während Progenitorzellen das embryogene Kollagen Typ IIA (COL2A) produzieren (Sandell und Aigner 2001, von der Mark 1999).

Typ	molekulare Form	Merkmale	Lokalisation
I	$[\alpha_1(\text{I})]_2 \alpha_2 \quad [\alpha_1(\text{I})]_3$	quergestreifte Fibrillen	Haut, Knochen, Sehnen, Bänder
II	$[\alpha_1(\text{II})]_3$	quergestreifte Fibrillen	Knorpel, Glaskörper
VI	$\alpha_1(\text{VI})\alpha_2(\text{VI}) \alpha_3(\text{VI})$	Mikrofibrillen	ubiquitär
IX	$\alpha_1(\text{IX}) \alpha_2(\text{IX}) \alpha_3(\text{IX})$	Fibrillen assoziiert (FACIT)	assoziiert mit Kollagen Typ-II
X	$[\alpha_1(\text{X})]_3$	hexagonales Netzwerk	hypertrophierender Knorpel
XI	$\alpha_1(\text{XI}) \alpha_2(\text{XI}) \alpha_3(\text{XI})$ $\alpha_1(\text{XI}) \alpha_2(\text{V})$	Fibrillen (mit Typ-II)	Knorpel

Tab. 1: Charakteristika der Kollagentypen des Knorpels (modifiziert nach von der Mark 1999)

4.2.3.1.2. Kollagen Typ I

Kollagen Typ I (Tab. 1) ist im menschlichen Körper das häufigste Kollagen und hat die Funktion, durch seine groben Bündel (20- 100nm) Zugfestigkeit herzustellen. 90% der organischen Knochen und Sehnenmasse besteht aus Typ I Kollagen. Es ist aus zwei gleichen α_1 - Peptidketten und einer davon differierenden α_2 – Peptidkette aufgebaut. Neben der atypischen Bildung des Typ I Kollagen im Knorpel bei dedifferenzierten Knorpelzellen, die sich osteoblastenähnlich differenzieren (Sandell und Aigner 2001), wird Kollagen Typ I im Korium, Knochen, Sehnen und Faszien von Fibroblasten, Chondroblasten, Osteoblasten und Odontoblasten gebildet (Junqueira und Caneiro 1996). Die Kollagen Typ I- Synthese wird von TGF- β_3 stimuliert und von Vitamin D3 und Parathormon inhibiert (von der Mark 1999).

4.2.3.1.3. Kollagen Typ X

Typ X Kollagen (Tab. 1) ist ein kurzes Homotrimer und wird im gesunden Gelenkknorpel nur im kalzifizierten Knorpel oder von hypertrophen Knorpelzellen der Epiphysenplatte gebildet. Allerdings produzieren hypertrophe Chondrozyten in geschädigten Arealen auch Typ X Kollagen. Eine Zunahme von Kollagen Typ X ist bei der Osteoarthritis vor allem in der tiefen und kalzifizierten Schicht zu verzeichnen (Sandell und Aigner 2001, von der Mark 1999).

4.2.4. Glykane

Als hydrophile Moleküle sind den Glykanen die Proteoglykane (Aggrecan, Decorin, Biglycan u.v.m.), Glykosaminoglykane (Hyaluronsäuren, Chondroitinsulfat, Keratansulfat u.v.m.) und Glykoproteine (Fibronectin, Chondronektin u.v.m.) untergeordnet. Sogenannte Minor- Proteoglykane wie Decorin, Lumican, Fibromodulin und Biglycan vollenden die strukturellen Eigenschaften der EZM (Abb. 4).

4.2.4.1. Proteoglykane

Der Proteinanteil, ein fadenförmiger, zentraler Kern (core protein, Molekulargewicht von 250.000- 300.000 Da), ist mit Heteroglykanketten (Glykosaminoglykanen) enormer Länge kovalent verbunden und wird intrazellulär von Chondrozyten oder Synoviozyten gebildet (Abb. 4). Die aus repetitiven Disaccharideinheiten bestehenden linearen Ketten sind durch

ihre Karboxyl- und Sulfatgruppen negativ geladen und werden als saure Glykosaminoglykane bezeichnet. Im extrazellulären Raum erfolgt die Aggregation, so dass das Molekül die Form einer Flaschenbürste einnimmt. Die enorme Wasserbindungskapazität entsteht durch die negativen Ladungen um die mehrschichtige Hydratationshülle und führt bei Druckeinwirkung zur Abstoßung der negativen Ladungen sowie zur hohen Druckelastizität des hyalinen Knorpels. Stabilität wird im Komplex mit Proteoglykan, Hyaluronsäure und Kollagen Typ II erreicht. Außerdem können Wachstumsfaktoren wie z.B. bFGF an den Seitenketten gebunden werden. Proteoglykane spielen eine wichtige Rolle bei der Induktion von Kalzifizierung. Im Laufe des Alterungsprozesses ändert sich die Zusammensetzung der Proteoglykane. Hormone (Insulin) und Zytokine (IGF-I) regulieren die Biosynthese von Proteoglykanen. So hemmen hohe Dosen von Steroidhormonen, Schilddrüsenhormone und Zytokine (Interleukin-1, Interleukin-6) die Biosynthese (Poole 1986) und TGF- β , EGF und PDGF stimulieren sie.

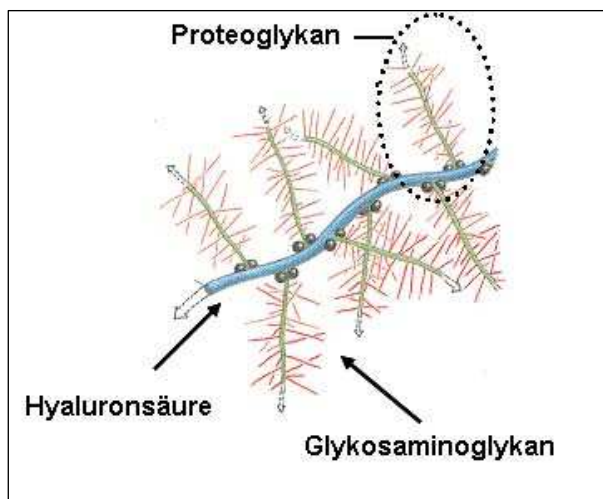


Abb.4 :
Hyaluronsäure-Proteoglykan-Komplex
(entnommen und modifiziert aus
www.pbm.utwende.nl)

4.2.4.1.1. Aggrecan

Der häufigste Vertreter der Proteoglykane im Knorpel ist das Aggrecan. Mit einem Molekulargewicht von 3000kDA besitzt es drei globuläre Domänen (G_1 , G_2 , G_3) und zwei dazwischenliegende Regionen (E_1 , E_2). Durch die Bindung der G_1 - Domäne mit dem sehr langen, linearen Molekül Hyaluronsäure werden sehr große Aggregate über die Verbindungsproteine (link proteins) gebildet. Hyaluronsäuren sorgen für die Ordnung zwischen den Proteoglykanaggregaten, indem räumliche Strukturen erzwungen werden (Knöpfel 2002). An die E_2 - Domäne binden Glykosaminoglykane und bewirken die starke Wasserbindungsfähigkeit, die nur durch die Maschen des Kollagennetzwerkes eine

Begrenzung erfährt. Der so resultierende, enorme Druck ermöglicht die belastungsabhängige, viskoelastische Verformung des Knorpels (Mollenhauer und Aurich 2003, Junqueira und Caneiro 1996, Kuettner 1994, Martinek 2003).

4.2.5. Wachstumsfaktoren

Wachstumsfaktoren sind Proteine oder Glykoproteine, die mit ihren entsprechenden Rezeptoren der Steuerung von Zellproliferation und der Differenzierung im Gewebe dienen. Die Rezeptoren vermitteln häufig die Aktivierung über tyrosinspezifische Tyrosinkinasen, second messenger- Systeme und mitogen- activated- protein- kinase- Kaskaden (MAPK), die DNA- Replikation und schließlich die Transkription. Die Regulation der Wachstumsfaktoren ist vielfältig und im Gesamten noch nicht vollständig geklärt. Prinzipiell regulieren sie sich über wechselseitige Wirkungsbeeinflussung (Till 1999).

4.2.5.1. Bone Morphogenetic Protein- 7 (BMP-7)

BMPs gehören zur TGF- β Superfamilie, die aus einem Vorgängermolekül durch proteolytische Spaltung des Propeptides in die aktive Form überführt werden. Bisher sind 30 BMPs identifiziert worden (Ducy und Karsenty 2000). Über einen transmembranalen Serin-Threonin-Kinase- Rezeptor wird die Wirkung der BMPs übermittelt, die aus einem Heterodimerkomplex mit dem Rezeptortyp- I (BMPR I A+B) und - II (BMPR II) zusammensetzt ist. Während der Rezeptor BMPR I A die Chondrozytendifferenzierung reguliert, initiiert BMPR I B die Apoptose und die Knorpelformation (Zou et al. 1997). Die intrazelluläre Signaltransduktion erfolgt über Smad- Proteine (Nakayama et al. 2000). Urist fand 1965 heraus, dass BMP, wenn es an atypischen, nichtossären Stellen injiziert wird, zur ektopen Knochenbildung führt (Urist 1965+1971). Nach dem Entdeckungsort, der demineralisierten Knochenmatrix, sind die BMPs auch als OPs (Osteogenic Proteins) benannt worden. BMP-7, ein 36kDA Homodimer, entfaltet seine Wirkung vor allem bei Reparatur- und Heilungsprozessen, während der Skelettembryogenese und im adulten Lebewesen auch in Nervenzellen, Nieren und Sehnen (Aspenberg und Forslund 2000). Zusammen mit den FGFs (Fibroblast Growth Factor) wirkt BMP bei der Organogenese (Riley et al. 1996, Wozney und Rosen 1998, Duncan und Watt 2001). BMP kann Wachstum und Differenzierung verschiedener Zelltypen vermitteln, auch die Stimulation

der Matrixsynthese sowie die Synthese von Alkalischer Phosphatase und Kollagensynthese durch Chondroblasten und Osteoblasten (Vukicevic et al. 1989, Reddi 1992). Es vermittelt einen stärkeren osteoinduktiven Reiz als mechanische Stimuli (Aspenberg und Forslund 2000). Im Gelenkknorpel werden große Mengen an BMP's gebildet, die in aktivierter und inaktiver (pro BMP-7) Form vorliegen. In der aktivierten Form führen sie zu einer Steigerung der Synthese der EZM und induzieren die Chondrogenese und Osteogenese. Im osteoarthritischen Knorpel ist die aktivierte BMP-7- Form, die sich vorwiegend in den oberflächlichen Schichten befindet, vermindert und die der inaktiven in den tiefen Schichten vermehrt. Eine mögliche Beeinflussung des Anabolismus der EZM wird demzufolge über Proteinasen, die die pro BMP-7 in die aktivierte BMP-7- Form umwandeln, vermittelt (Sandell und Aigner 2001). Demzufolge wird dem BMP- 7 eine Schutzfunktion der Knorpelmatrix vor unspezifischen Entzündungen und invasiver Zerstörung zugeschrieben (Chubinskaya und Kuettner 2003). Unter in vitro- Bedingungen stimuliert BMP-7 vor allem die Aggrecan- Synthese und Hyaluronsäuresynthese (Nishida et al. 2000).

4.2.5.2. Basic Fibroblast Factor (bFGF)

Die Proteinfamilie der FGF's (fibroblast growth factor) weist 9 Vertreter (FGF1- FGF9) auf, die vor allem bei der Bindegewebsneubildung, Wundheilung, Angiogenese und Neuritenbildung entscheidend sind. bFGF entspricht dem FGF2, besteht aus einem 146 Aminosäuren langem Polypeptid (18 kDA) und ist vorwiegend in der EZM an heparansulfathaltige Proteoglykane gebunden (Till 1999). Ihre Signaltransduktion erfolgt über vier Tyrosin- Kinase- Rezeptoren. Seine vielfältigen Wirkungen vor allem in Embryogenese, Organogenese (Wang und Aspenberg 1993, Shida et al. 2001) und Skelettentwicklung erfüllt es zusammen mit den BMPs (Broadley et al. 1989, Martin 1998). Wang und Aspenberg und Shida et al. zeigten den Einfluss von bFGF auf die Umdifferenzierung von Chondrozyten und die mitogene Wirkung von bFGF auf die Knorpelzellen (Wang und Aspenberg. 1993, Shida et al. 2001). bFGF stimuliert mesenchymale Zellen, die später zu Chondrozyten differenzieren (Wang und Aspenberg 1993). Widersprüchliche Ergebnisse werden bezüglich der Wirkung auf Kollagen Typ II beschrieben. In- vitro Untersuchungen ergeben die Hemmung der Kollagen Typ II- Expression und der Enddifferenzierung der Knorpelzellen (Shida et al. 2001), während in- vivo Untersuchungen die Stimulation der Expression von Kollagen Typ II durch bFGF

zeigen (Nakajima et al. 2001, Shida et al. 2001). Unter den Monolayer- Bedingungen induziert bFGF die Redifferenzierung der dedifferenzierten Chondrozyten zu reifen Chondrozyten (Martin et al. 1999).

4.2.5.3. Vascular Endothelial Cell Growth Factor (VEGF)

VEGF ist wegen seiner charakteristischen acht Cysteinreste, ein Mitglied der PDGF (platelet derived growth factor)- Familie (Neufeld et al. 1994). Als endothelzellen-spezifisches Mitogen ist VEGF ein Regulator der Angiogenese, der Permeabilität von Blutgefäßen, der Proliferation von Endothelzellen und ist entscheidend für die embryonale Entwicklung. Weitere vielfältige Wirkungen hat VEGF auf die Wundheilung, im weiblichen Reproduktionssystem, bei der koronaren Herzkrankheit (Schultz et al. 1999, Poltorak et al. 2000), bei Vaskularisation von Tumoren (Senger et al. 1983), bei Retinopathien und bei der rheumatoiden Arthritis (Ferrara und Gerber 2001, Jackson et al. 1997) und sollen nur aufgezählt werden. Des Weiteren wird durch VEGF die Angiogenese der Epiphysenplatte stimuliert, die letztlich zum Knochenwachstum führt (Gerber et al. 1999). Monozyten, Lymphozyten, Thrombozyten und Fibroblasten sind in der Lage, diesen Wachstumsfaktor zu produzieren (Ferrara 1999, Pufe et al. 2001). Es gibt fünf verschieden VEGF- Isoformen ($\text{VEGF}_{121, 145, 165, 189, 206}$) von 121 bis 206 Aminosäuren, die durch alternatives Splicing gebildet werden. Zellen können mehrere Isoformen gleichzeitig produzieren (Bacic et al. 1995). Die Exone 6 und 7 kodieren für eine Heparin-bindungsstelle und führen bei den Isoformen VEGF_{145} und VEGF_{189} zu einer verstärkten Bindung in der extrazellulären Matrix an die heparansulfathaltigen Proteoglykane, im Gegensatz zu den kürzeren Isoformen wie z.B. VEGF_{121} , die bessere Diffusions-eigenschaften besitzen (Ferrara 1999, Poltorak et al. 2000). Induktor der Expression von VEGF ist die Hypoxie (Shweiki et al. 1992, Pufe et al. 2001). Die Signaltransduktion von VEGF erfolgt über die Bindung an den Tyrosinkinase-rezeptor VEGFR-1 oder VEGFR-2 (Neufeld et al. 1999, Poltorak et al. 2000), der zu einer Mitosesteigerung und schließlich zur Umorganisation des Zytosklettes führt. Eine Steigerung der chemotaktischen Beweglichkeit führt zum Aussprossen neuer Gefäße (Till 1999). Die Blutversorgung reicht in den Röhrenknochen mittels subchondraler Blutgefäße bis zum subchondralen Knochen, die gelegentlich in den kalzifizierenden Knochen und selten auch durch die Tidemark penetrieren können. Normalerweise sind sie vom Knorpel immer durch einige Knochenlamellen getrennt. Es konnte gezeigt werden, dass Knorpelzellen einen

niedrigmolekularen Antiinvasionsfaktor (AIF) produzieren, der die avaskuläre und unkalzifizierte Matrix vor der Invasion von Endothelzellen schützt und sogar den Abbau der Matrixmoleküle inhibiert (Kuettner und Pauli 1983). VEGF wird unter ausgeglichenen Verhältnissen von Chondrozyten exprimiert und erfährt unter den hypoxischen Zuständen der Osteoarthritis eine deutliche Vermehrung mit deutlicher Korrelation zum Arthrostadium (Pfander et al. 2001a).

4.2.5.4. Transforming Growth Factor- β (TGF- β)

TGF- β bildet drei Spezies (TGF- β 1- TGF- β 3), die mit unterschiedlicher Affinität an vier Rezeptortypen binden können. Es wird als inaktive Vorstufe freigesetzt, an Zelloberflächen sowie extrazellulären Matrixproteinen gebunden und extrazellulär von Proteinasen oder durch Ansäuerung als aktiver Metabolit, einem Dimer, aus dem Komplex gelöst. Es vermittelt die Regulation der Gewebenachbildung durch Stimulation der Proliferation mesenchymaler Zellen und wirkt dem IL- 1 entgegen (Kuettner 1994, Till 1999). Speziell kann TGF- β durch Chemotaxis und Zellaktivierung die Bildung von extrazellulärer Matrix anregen und vermitteln. Folglich kann die Matrixsynthese (Kollagen, Proteoglykane, Integrine) gesteigert und der Matrixabbau durch Hemmung der Synthese von Proteinasen und Förderung der Synthese von Proteinaseinhibitoren vermindert werden. TGF- β stimuliert die Kollagen Typ I und - III- Synthese, supprimiert die Transkription von Kol-2A1 und der MMP's (von der Mark 1999). Unter in vitro- Bedingungen stimuliert TGF- β die Proteoglykansynthese stärker als das BMP (Van Osch et al. 1998). Geringe Transkriptmengen von TGF- β und Nonresponder auf die TGF- β Stimulation (Verschure et al. 1994) führen zur Chondrozytenhypertrophie. Daraus resultiert ein reduzierter Proteoglykangehalt und ein vermehrter Kollagen Typ X- Gehalt (von der Mark et al. 1992). Widersprüchliche Daten betreffen die Rolle des TGF- β bei der Osteoarthritis (Serra et al.1997), sowohl protektive als auch fördernde Wirkungen werden ihm zugesprochen (Van den Berg 1995). Als Induktor der Apoptose verzögert eine Inhibierung der Signalkaskade den programmierten Zelltod und führt zu einem Anstieg von hypertrophen Knorpelzellen (Serra et al. 1997). Weiterhin spielt TGF- β eine bedeutende Rolle bei der Wundheilung, Knorpel- und Knochenbildung, bei fibrosierenden Erkrankungen, Immunsuppression, Tumorwachstum und bei der Hemmung der Hämatopoese (Till 1999). Seine Bedeutung liegt ferner in der Kontrolle des Zellzyklus, in

der frühen Regulation der Differenzierung sowie in der Regulation und Reparatur von Zellen des Nervensystems (Krieglstein et al. 1988, Böttner et al. 2000).

4.2.6. Zytokin: Interleukin- I (IL- 1)

IL- 1 ist in die Gruppe der Zytokine einzuordnen und ist ein Akute- Phase- Protein (Glykoprotein), welches durch zwei Gene kodiert wird. Während IL-1 α zellständig ist und parakrine Wirkungen entfaltet, wird IL- 1 β sezerniert und wirkt endokrin. Hauptsächlich wird IL- 1 von Monozyten gebildet, aber auch spezifisch aktivierte Endothel-, Epithelzellen und Fibroblasten sind in der Lage IL- 1, zu produzieren. Neben vielen, charakteristischen Wirkungsweisen sollen hier nur einige für die Bindegewebe benannt werden. Im arthrotischen Gelenk führt IL-1 durch die Aktivierung der Cyclooxygenase- 2 (COX- 2) und Bildung von Prostaglandin E₂ zur Degradation von Knorpel. IL- 1 induziert die Proliferation von Fibroblasten und anderen Bindegewebszellen und die Produktion von Wachstumsfaktoren wie z.B. TGF- β und führt zur Freisetzung proteolytischer Enzyme (MMPs), die die EZM abbauen (Till 1999). Demzufolge induziert Il- 1 den Wechsel des Phänotyps Chondrozyt in fibroblastenähnliche Zellen, der sogenannten Dedifferenzierung. Dedifferenzierte Knorpelzellen produzieren anstelle von Aggrecan und Kollagen Typ II, Kollagen Typ I, III und V (von der Mark 1999, Sandell und Aigner 2001).

4.2.7. Knorpelstoffwechsel

In gesundem Knorpel eines Erwachsenen produzieren Knorpelzellen extrazelluläre Matrixkomponenten sehr langsam. Sie haben eine geringe metabolische Aktivität. Ihr Phänotyp ist stabil. Während der Entwicklung werden die Prozesse durch anabole Zytokine und Wachstumsfaktoren wie z.B. TGF- β , BMP`s und IGF-1 stimuliert (Sandell und Aigner 2001). Normale physiologische Stoffwechselprozesse beschreiben eine Homöostase zwischen einer balancierten Synthese von Matrixmolekülen und einem kontrollierten Abbau. Die metabolischen Regulationsmechanismen sind im Organismus kaum aufgeklärt. In Experimenten konnte der Turnover der Martrixkomponenten für Proteoglykane und Kollagen erforscht werden. Während Proteoglykane eine Halbwertszeit von 25 Tagen besitzen, beträgt sie für die Kollagene 400- 800 Tage (Buckwalter und Mankin 1997).

4.3. Osteoarthrose

Die Osteoarthrose (OA) ist eine multifaktorielle Krankheit von Gelenken, die mit Knorpelverlust, Umwandlung des subchondralen Knochens und Entzündungsreaktionen der Synovialis und gelenkassoziierten Strukturen einhergeht und spezifische anatomische, radiologische und klinische Merkmale besitzt. Die sekundäre Arthrose beschreibt ein Missverhältnis zwischen Belastung und Regeneration, welches auch schon in jungen Jahren, z.B. durch traumatische Gelenkschäden und Knorpeldefekte, zustande kommen kann, denn es findet keine spontane Heilung durch Einwachsen von Chondrozyten in den Defekt statt. Defekte werden durch minderwertiges, faserknorpeliges Gewebe ersetzt. Weitere Überlastungsmöglichkeiten ergeben sich durch Übergewicht, Überlastung im Sport oder Beruf, instabile Bandapparate, Deformitäten, aber auch nach hohen Kortikoiddosen und aseptischer Nekrose.

In osteoarthritischen Gelenken ist das Gleichgewicht des stabilen Chondrozyten-Phänotypes verloren gegangen. Während des Prozesses der Osteoarthrose manifestieren sich vielfältige Reaktionen auf molekularer Ebene, die von Sandell und Aigner (Sandell und Aigner 2001) in fünf Prozesse eingeteilt worden sind.

Der erste Prozess wird durch die Proliferation und Apoptose beschrieben. Die Proliferation der Chondrozyten verursacht die Clusterbildung. Der gesteigerte Turnover kann auch zur Apoptose führen. Eindrucksvoll ist die Hyperaktivität in der mittleren und tiefen Schicht im histologischen Bild darstellbar. Während in den oberen Schichten von OA- Knorpel ein deutlicher Proteoglykanverlust erkennbar ist, zeigt sich ein normales Bild in den tieferen Schichten. Im Folgenden verändert sich die Syntheseaktivität. Der Versuch der Chondrozyten die Knorpelmatrix zu erhalten, führt im zweiten Prozess zur Stimulation des Knorpelaufbaus vor allem in der mittleren und tiefen Zone durch die anabolen Zytokine IGF-1, TGF- β 1, -2,-3, FGF's 2, 4,-8, und BMP. Allerdings können sie nicht zu einem stabilen Gerüst zusammengefügt werden. Histologisch ist in diesen Zonen die EZM intakt. Die oberflächliche Schicht weist dagegen einen starken Verlust von Proteoglykanen auf (Sandell und Aigner 2001, Pullig et al. 2001). Der Dritte Prozess zeigt die Veränderung des Knorpelabbaus. Degenerative Prozesse überwiegen und gehen vom hypertrophen Chondrozyten selbst und von den Synovialzellen aus. Inflammatorische Zytokine (IL-1, TNF α , IL-17, IL-18) steigern die Synthese von Matrix- Metalloproteinasen (MMPs), die als degradierende Enzyme fungieren, inhibieren deren Inhibitoren (TIMP's) und verringern die Synthese der extrazellulären Matrix. Neben dem Verlust der Proteoglykane löst sich

das Kollagennetzwerk auf und verliert seine Funktion (Aigner und McKenna 2002). Stoffwechselspaltprodukte können dann im peripheren Blut nachgewiesen werden (Kuettner, 1994). An vierter Stelle steht die Modulation des Phänotyps der Chondrozyten (Abb. 5). Chondrozyten sind in der Lage, ihren Phänotyp zu verändern. Die Dedifferenzierung, d.h. die Ausbildung eines fibroblastenähnlichen Chondrozyten, wird beispielsweise durch IL- 1 vermittelt.

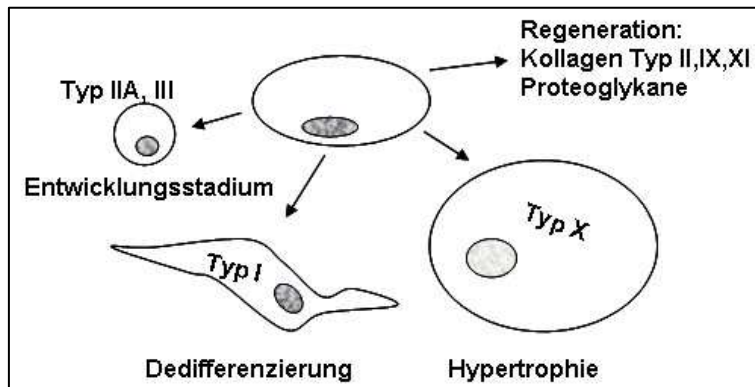


Abb. 5:
Modulation des Phänotypes,
entnommen und modifiziert
nach (Sandell und Aigner 2001)

Diese Zellen exprimieren kein Aggrecan und Kollagen Typ II, sondern Kollagen Typ I, III und V (Benya et al. 1978). Wird die alternative Splicevariante Kollagen Typ IIA gebildet, so hat der Chondrozyt den Phänotyp einer chondrogenen Vorläuferzelle eingenommen. Kollagen Typ X weist auf die Hypertrophie der Knorpelzelle hin. Junge Chondrozyten können sich nach einer hypertrophen Differenzierung in osteoblastenähnliche Zellen, die ebenfalls Kollagen Typ I bilden, verändern (Kirsch et al. 1992). Diese Veränderungen werden während der Osteoarthritis zonenspezifisch nachgewiesen (Sandell und Aigner 2001). In der Folge können die untypischen Matrixbestandteile wie Kollagen Typ X, Alkalische Phosphatase, Osteopontin, Osteonektin und Osteocalcin, die normalerweise von Osteoblasten und Chondrozyten der Wachstumsfuge gebildet werden, nachgewiesen werden (Pullig et al. 2001). Auch unter in vitro- Bedingungen findet ein Wechsel des Phänotypes statt, dessen Reversibilität nachgewiesen wurde (Benya und Schaffer 1982). Selbst isolierte Chondrozyten aus Gelenken mit Osteoarthrose können unter bestimmten Voraussetzungen z.B. einer dreidimensionalen Matrix redifferenzieren, produzieren dann allerdings weniger Kollagen (Tallheden et al. 2005). Die typische Osteophytenbildung steht im Prozess der Osteoarthrose an letzter Stelle. Mechanische und humorale Faktoren führen durch stimulierte pluripotente Zellen zur Neubildung von Knorpel und Knochen, dessen Funktion wahrscheinlich der Stabilisierung dient (Sandell und Aigner 2001).

4.3.1. Pathogenese

Stadium 1: Der Beginn der Arthrose ist die Knorpelerweichung (Chondromalazie). Die Unfähigkeit des Kollagennetzwerkes und die fehlenden Proteoglykane führen zu einer Hyperhydration des Knorpels, die in einer Schwellung endet (Maroudas 1976).

Entstehende oberflächliche Fissuren (Abb. 6), die sich progredient vertiefen, und leere Lakunen zeigen sich histologisch in Fibrillationen und Asbestfasern. Die Knorpelzellen hypertrophieren und formieren sich aufgrund der derangierten perizellulären Matrix und der veränderten Synthese von Kollagen Typ VI zu Zellhaufen, sogenannten Clustern (Mankin und Lipiello 1970, Mankin et al. 1971). Im subchondralen Knochen erfolgt eine Verdichtung und Verhärtung.



Abb. 6: mikroskopische makroskopische Darstellung osteoarthritischer Veränderungen (Martinez, 1997a+b)

Stadium 2: Die Fissuren (Abb. 6+7) vertiefen sich und durchsetzen den gesamten Knorpel. Oberflächlicher Knorpel wird mechanisch abgerieben, der durch die Partikel häufig zu einer Synovialitis mit Schwellung und Gelenkerguß führt. Synovialzellen bilden ferner proinflammatorische Zytokine wie $\text{TNF-}\alpha$ und $\text{IL-1}\beta$, die die Knorpelzerstörung durch die Aktivierung der Cyclooxygenase-2 (COX-2) fortsetzen. Des Weiteren werden durch Zytokine knorpelabbauende Kollagenasen gebildet und die Bildung von neuer EZM gehemmt. Proliferierende Chondrozyten aggregieren in sogenannten Brutkapseln. Gefäßführendes Bindegewebe proliferiert und dringt in den Knorpel ein.

Die Hyaluronsäuren werden im Prozess der OA depolymerisiert und können ihre Funktion, dem Abfangen von Gewicht und gleitende Bewegungen, nicht mehr ausreichend erfüllen.

Stadium 3: Das fortgeschrittene Stadium ist charakterisiert durch Ruheschmerzen. Häufig ist der Knorpel bis zum subchondralen, hyperostotischen Knochen abgerieben, so dass von einer Knochenglatze (Abb. 6+ 7) gesprochen wird. Es zeigen sich leere Lakunen, und Teile der Knochenplatte sind nekrotisch, so dass eine Verbindung zum Markraum hergestellt wird. Folge davon ist der Umbau zu Geröllzysten, die den Detritus abbauen sollen (Aigner und McKenna 2002).

Stadium 4: Der eröffnete Markraum der subchondralen Knochenplatte liegt eröffnet vor. Osteophytäre Anlagerungen bilden sich als Reaktion auf die fehlende Knorpelfunktion, um der Überlastung entgegen zu wirken.

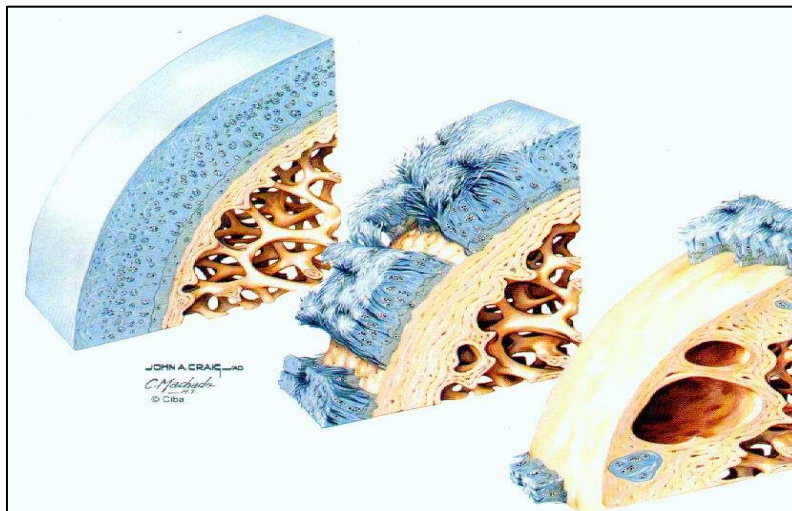


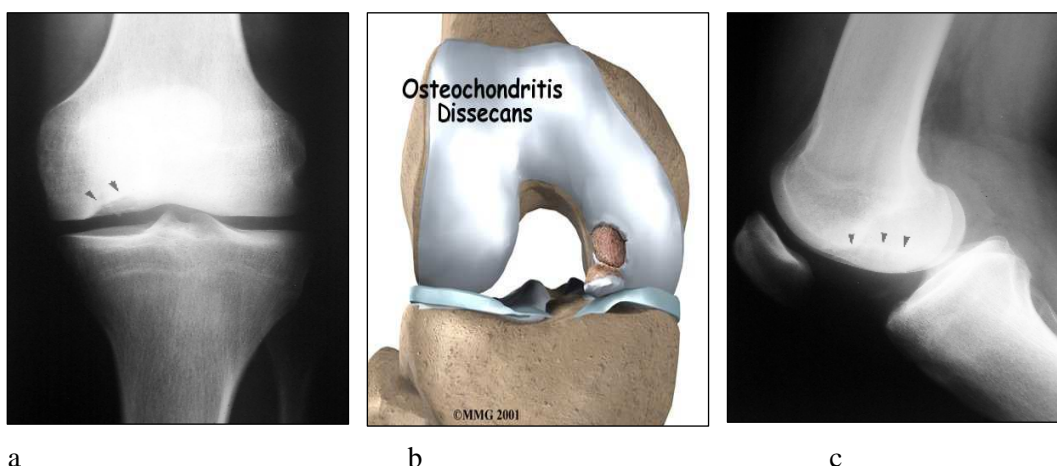
Abb. 7:
makroskopische Darstellung
osteoartrotischer
Veränderungen
www.actiforme.net

Diagnostisch stellen die bildgebenden Verfahren und die Arthroskopie neben der Labordiagnostik und der Untersuchung der Synovialflüssigkeit eine bedeutende Rolle dar. So werden im Röntgenbild typische Befunde wie Gelenkspaltverschmälerung, subchondrale Knochensklerosierung, randständige Osteophyten, subchondrale Knochenzysten und im Spätstadium große knöchernen Erosionen und / oder Nekrosen erkennbar (Knöpfel 2002).

4.4. OCD- Osteochondrosis dissecans

4.4.1. Definition

Die OCD (Abb.8 a-c) wird zur Gruppe der aseptischen Knochennekrosen gezählt. Sie ist eine Krankheit des subchondralen Knochens, die zur Demarkierung einer Knochen-Knorpel- Scheibe aus einer Gelenkfläche bis hin zum freien Gelenkkörper (Abb. 10a), unter Hinterlassung eines Knorpeldefektes, dem sogenannten Mausbett (Abb. 10b), führen kann (Bruns 1996, Venbrocks et al. 1988, Wagner 1964). Die Osteochondrosis dissecans wurde unter diesem Begriff erstmalig von König 1887 beschrieben. Die freien Gelenkkörper nannte er Corpora mobilia und sie würden mittels einer spontanen Nekrose durch eine dissezierende Entzündung freigesetzt werden.



a b c
Abb. 8: a+c) Röntgen li KG in 2 Ebenen, OCD med. FC (entnommen aus www.med.mun.de);
b) Schema einer OCD am rechten Kniegelenk, medialer Femurkondylus (entnommen aus www.eorthopod.com)

4.4.2. Ätiologie

Die Ätiologie der Osteochondrosis dissecans scheint multifaktoriell zu sein und wird kontrovers diskutiert. Traumatische/mikrotraumatische, vaskuläre, genetische, endogene sowie infektiöse Ursachen sind zu nennen. Abhängig vom jeweiligen Gelenk variieren die verschiedenen Ursachen (Bruns 1996, Schenck et al 1996). Am wahrscheinlichsten sind Traumata und Mikrotraumata auf spezielle Lokalisationen im Gelenk. Konstitutionelle Ursachen in Verbindung mit traumatischen Ursachen sind für die Genese der OCD sehr wahrscheinlich (Bruns 1996).

4.4.3. Lokalisation

Die häufigsten OCD- Herde befinden sich in Hauptbelastungszonen und sind konvex geformte und biomechanisch stark beanspruchte Gelenkflächen. Z.B. betreffen sie bei Lokalisation des Kniegelenkes (Abb. 8) in 75% den medialen Femurkondylus (Bruns 1996, Schenck et al. 1996). Des Weiteren wirken zusätzliche Faktoren wie beispielsweise Achsenfehlstellungen, Bandinstabilitäten, Übergewicht und erhöhte Belastung als prädisponierende Faktoren (Bruns 1996, Schenck et al. 1996, Smillie 1960). Theoretisch können alle Gelenkflächen betroffen sein. Am häufigsten ist das Kniegelenk betroffen, danach folgen das Ellenbogengelenk, das obere Sprunggelenk und sehr selten Schulter-, Hüftgelenk und Patella (Bruns 1996). Besonders im Talus ist eine traumatische Ursache, häufig ein Supinationstrauma, anzunehmen (Alexander und Lichtmann 1980). Die OCD des Ellenbogens ist das Ergebnis einer Überbeanspruchung und betrifft dann meist das Capitellum und tritt vorwiegend nach dem Epiphysenschluß als lokale Nekrose in Erscheinung (Bruns 1996).

4.4.4. Pathogenese/ Epidemiologie

Je nach Epiphysenfugenstatus wird die juvenile und adulte Form der OCD unterschieden (Schenck et al. 1996). Wagner differenziert zwei Verlaufsformen: die dissezierende Form, die vor allem in der Jugend bis zu einem Alter von 20 Jahren erkennbar wird, und die malazischen Form, die in jedem Lebensalter eintreten kann (Bruns 1996, Wagner 1964). Bei der letzteren Form verändern sich knorpelinterne Strukturen, die zur Auflösung und Ablösung in die Synovialflüssigkeit neigen. Die von Wagner 1964 dargestellte malazische Form könnte ätiopathogenetisch einen Zusammenhang zwischen der spontanen Osteonekrose des Mb. Ahlbäck und der malazischen Form der OCD aufweisen, der aber bis heute nicht vollständig geklärt ist (Bruns 1996). Das Maximum der Inzidenz und Prävalenz der OCD liegt im 2. Lebensjahrzehnt (Bruns 1996, Venbrocks et al. 1988). Die Geschlechterverteilung von Männern zu Frauen liegt bei 2:1. Sind bilaterale Läsionen vorhanden, erhöht sich die Ratio auf 3:1 (Bruns 1996, Nagura 1960, Green and Banks 1953). Die Pathogenese (Abb. 9) der OCD ist in drei Stadien einzuteilen. Das Initialstadium beginnt mit einer subchondralen Osteonekrose und betrifft vorerst den Knochen. Ausgehend von den Mediatoren der Nekrosezone wird der Prozess der Regeneration induziert, der zu einer restitutio ad integrum führen kann (Bruns 1996,

Wagner 1964). Das Stadium der Sklerosierung/ Demarkation würde sich in der Pathogenese anschließen, wenn sich durch andauernde Auslöser wie Mediatoren, Traumata, Stoffwechselstörungen oder Regenerationsstörungen, der subchondrale Knochen verdichtet und sich die biomechanischen Eigenschaften dieses Areals deutlich verändern. Histologisch ist zwischen Sklerose und Dissekat die fibröse Nekrosezone zu beobachten. Die Dissekatbildung (Abb. 9+10a) wird im dritten Stadium beschrieben. Der knorpelige Anteil des Dissekates weist noch keine Kontinuitätsunterbrechung auf, während im knöchernen Teil avitaler und vitaler Knochen nebeneinander liegen. Die biomechanischen Eigenschaften des Gelenkknorpels können in diesem Bereich die Kräfte nicht verwalten und demarkieren durch die fehlende Blutversorgung das osteochondrale Dissekat ohne Reintegration. Das Dissekat in situ wird nur noch oberflächlich von erweichtem Knorpel und am Grunde von fibrösem Material gehalten. Ein freier Gelenkkörper (Abb. 9+10a) entsteht, wenn es keine Verbindung zum umgebenden Gewebe mehr gibt. Der Boden des Mausbettes kann über der Sklerosezone von lockerem Bindegewebe bedeckt sein und rundet sich zu den Rändern hin ab. Der Stillstand der Dissekatbildung kann, vor allem in den frühen Stadien durch eine *resitutio ad integrum* gekennzeichnet sein (Arcq 1974).

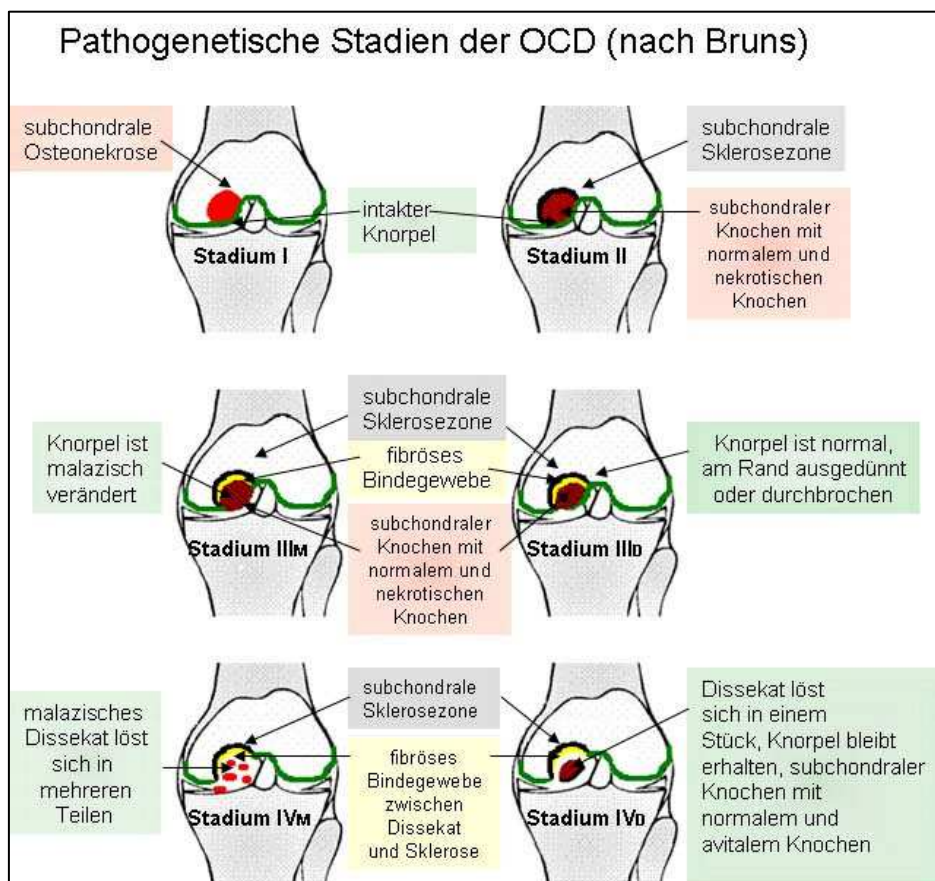


Abb. 9:
Schematische
Darstellung der
pathogenetischen
Stadien der OCD
am Kniegelenk
(modifiziert nach
Bruns)

4.4.5. Klinik

Die klinischen Symptome der OCD sind unspezifisch. Es werden belastungsabhängige Schmerzen, Schwellung, Blockierung und das Giving- Way- Phänomen im Kniegelenk angegeben. Letzteres kann durch den Wilson- Test provoziert werden. Bei betroffenem medialen Kondylus des Kniegelenkes wird durch Streckung des in 30° Flexion und Innenrotation gehaltenen Kniegelenkes ein Schmerz verursacht, der in Außenrotation nachläßt (Wilson 1967). Im Stadium der Dissekation spezifizieren sich die Symptome, da als Folge des freien Gelenkkörpers (Abb. 10a) häufiger Blockierungserscheinungen auftreten (Schenck et al. 1996, Bruns 1996). Im Ellenbogengelenk treten hauptsächlich Gelenkblockaden auf, im Sprunggelenk vor allem Schwellung und Instabilität.

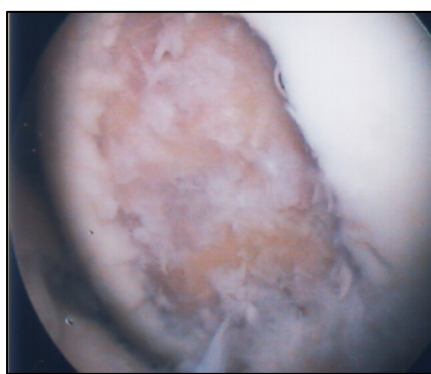


Abb. 10:
a) makroskopisches
Bild eines Dissekates
b) arthroskopisches
Bild eines Maus-
bettes ICRS
Stadium IV

4.4.6. Apparative Diagnostik

Mittels Röntgenbild in zwei Ebenen (Abb. 8a+c), sowie Spezialaufnahmen werden im Zeitalter des MRT's (Magnetresonanztomographie) (Abb. 11) eine erste, orientierende Diagnostik und die Suche nach sekundären Veränderungen durchgeführt. Allerdings kann hiermit keine Beurteilung des Knorpels direkt erfolgen, da Weichteile durch Röntgen nicht beurteilbar sind. Der Goldstandard in der Beurteilung von Knorpel- und Weichteildefekten ist das MRT (Abb. 11), mit dem ohne Strahlenbelastung, mit freier Rekonstruierbarkeit und einer hohen Sensitivität und Spezifität die Diagnose der OCD schon im Initialstadium gestellt werden kann. Die Integrität der Knorpeloberfläche wird durch die intraartikuläre Injektion von Gadolinium verbessert dargestellt (Bruns 1996, Schenck et al. 1996, Dipaola et al. 1991). Außerdem wird das MRT als Instrument zur Verlaufskontrolle genutzt (Gröneweller 2003, Roberts et al. 2003, Marlovits et al. 2004).

Mittels MRT- Klassifikation kann ein Knorpeldefekt durch veränderte Signalgebung, Irregularitäten der Struktur sowie Veränderungen der Knorpeldicke eingeteilt werden (Gröneweller 2003):

- Grad I: intakte Oberfläche mit knorpelinterner Signalabweichung
 Grad II: Knorpeloberfläche gering irregulär, fokale Reduzierung der Knorpeldicke um weniger als 50%
 Grad III: Knorpeloberfläche zeigt schwere Irregularitäten, fokale Reduzierung der Knorpeldicke um 50 – 100 %
 Grad IV: kompletter Verlust des Knorpels und freiliegender subchondraler Knochen



Abb. 11: a-c MRT der O.d. genus des medialen Kondylus a) Sagittalebene, b) Koronarebene, c) Transversalebene

4.4.7. Arthroskopie

Die Indikation zur Arthroskopie (Abb. 11b) ist mit einer Therapie gekoppelt, bei der die Defektbeurteilung, d.h. Größe, Tiefe und die Grenze zum Gesunden genau beurteilt werden kann. Hierbei erfolgt die objektive Einteilung des Knorpelschadens in Stadien, z.B. der Klassifikation nach Outerbridge (Outerbridge 1983)(Abb. 12) oder dem Cartilage Grading System (ICRS Evaluation Package). Allerdings bleiben dem Operateur subchondrale Strukturen verborgen. Sinnvoll ist die Kombination aus Bildgebung und Arthroskopie, damit die Größe des Defektes, Lokalisation, statische Relevanz und die Defekttiefe genau beurteilt werden können.

Je nach Defektgröße, Alter des Patienten und lokaler Entzündung würden bei Knorpeldefekten bis 1cm^2 die Mikrofrakturierung (Sledge 2001, Steadman et al. 1997), die OCT mittels Mosaikplastik (Defektgröße $1\text{-}3\text{cm}^2$) oder die ACT (Defektgröße zwischen 3-

14cm²) als Therapiemöglichkeiten (Brittberg et al. 1994) zur Auswahl stehen. Derzeit werden bezüglich der ACT mikroinvasive Verfahren mittels Arthroskopie erprobt. Nach erfolgreicher ACT wird eine sogenannte second look- Arthroskopie nicht empfohlen. Die Kontrolle der ACT erfolgt mittels MRT. In Entwicklung befinden sich weitere Verfahren, so z.B. Diffraction Enhanced Imaging (DEI) (Mollenhauer et al. 2002, Li et al. 2005). Die ICRS (International Cartilage Repair Society) entwickelte zur Vereinheitlichung einen Score für die Unterteilung der Läsionen des Knorpelgewebes aus dem ICRS Cartilage Injury Evaluation Package (<http://www.cartilage.org>)

- ICRS OCD I: subchondrale Erweichung, Osteonekrose / Osteolyse, von intaktem Knorpel bedeckt
- ICRS OCD II: partielle Diskontinuität, Defektareal stabil bei Sondierung
- ICRS OCD III: komplette Diskontinuität, Dissekat in situ, d.h. Dissekat nicht disloziert
- ICRS OCD IV: disloziertes Fragment, leeres Mausbett
- ICRS OCD IVB: Defekttiefe > 10mm

Outerbridge Klassifikation:

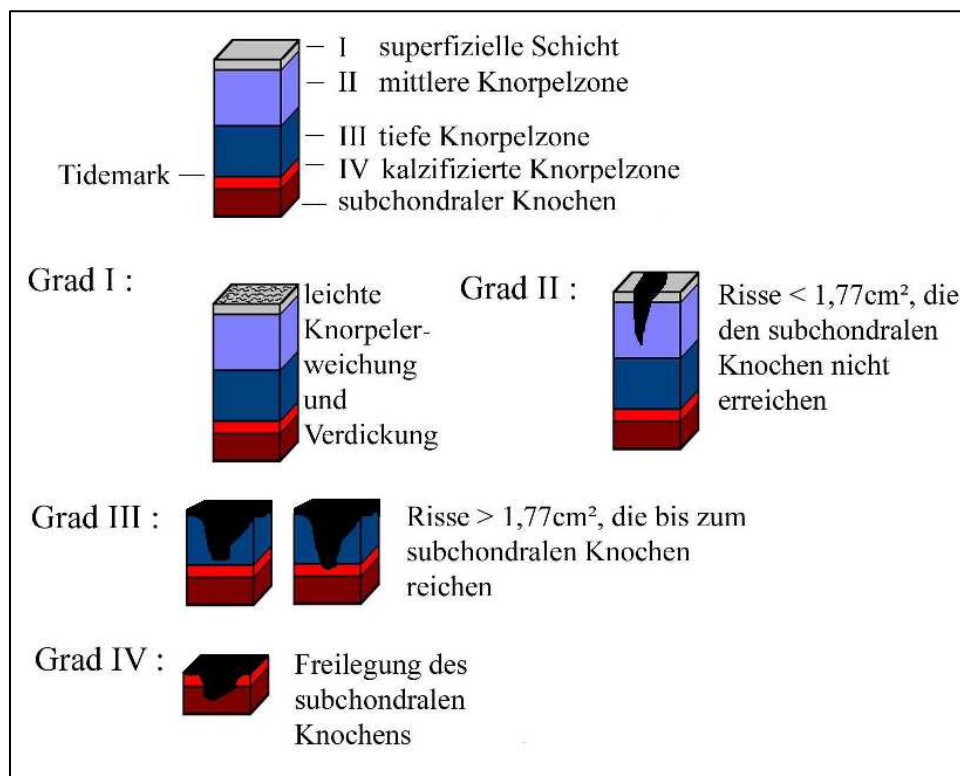


Abb. 12:
Outerbridge –
Klassifikation
Stadienein-
teilung von
Knorpel-
defekten
(modifiziert)

4.4.8. Differentialdiagnose

Differentialdiagnostisch sind osteochondrale Defekte, osteochondrale Frakturen anderer Genese, z.B. durch ein akutes Trauma zu nennen (Bruns 1996, Schenck et al. 1996). Aufgrund der unspezifischen Klinik können auch Chondromatosen, Kniebinnenschäden wie beispielsweise Läsionen des Meniskus und Kapsel- Band- Läsionen das Bild einer OCD annehmen. Weiterhin abzugrenzen wären Erkrankungen der Synovialis, Tumore und Fremdkörper.

4.4.9. Therapie und Prognose

Bis jetzt gibt es keine universal einsetzbare Therapie von Gelenkknorpelschäden. In niedrigen Stadien ist eine konservative Therapie entscheidend. Ziele sind die Revitalisierung des osteochondralen Areal, das Verhindern der Progression, z.B. der Dissekatabildung, die Entfernung oder Refixation von Fragmenten und die Prävention der Osteoarthrose. Dazu werden verschiedene Verfahren angewendet. Die konservative Therapie wird in Stadium I und II angewendet und zielt auf die Entlastung des Gelenkes ab. Dies wird durch Sportkarenz, Ruhigstellung, Gewichtsreduktion, Korrektur von Kniebinnenschäden und Risikofaktoren in Verbindung mit speziellen Formen der Physiotherapie erreicht, damit entzündliche Prozesse und ein Fortschreiten der Degeneration den Heilungsprozess nicht gefährden (Bruns 1996). Zu beachten ist auch, dass vor allem bei Kindern die Ausheilung eines OCD- Defektes spontan verlaufen kann (Gaissmaier et al. 2003, Bruns und Rosenbach 1992, Hefti et al. 1999, Sales de Gauzy et al. 1999). Ziele der operativen Therapie sind die Integrität des biologischen Gewebes, Knorpel mit idealer mechanischer Beanspruchbarkeit zu rekonstruieren (Petersen et al. 2003) und der Erhalt des Gelenkes. Eine rasche Intervention ist bei OCD mit losem Knorpelknochenfragment speziell im Erwachsenenalter gegeben, da eine fehlende operative Versorgung schlechtere Langzeitergebnisse ergeben hat (Bruns und Rosenbach 1992, Anderson und Pagnani 1997, Aglietti et al. 2001). Häufig werden die anterograde und retrograde Anbohrung, die subchondrale Spongiosaplastik, die Dissekatrefixation bzw. -entfernung, die Priedie- Bohrung (Priedie 1959) und die Knorpel- Knochen- Transplantation angewendet. Größere Defektareale im Stadium III- IV (ICRS) können nach strenger Indikationsstellung erfolgreich mit der ACT saniert werden. Die Prognose bei Patienten mit noch offenen Wachstumsfugen ist relativ gut. Die Entstehung einer Arthrose ist als sehr gering einzuschätzen, während sich im Erwachsenenalter bezüglich

der Gonarthrose eine höhere Prävalenz zeigt (Bruns 1996, Linden 1977). Besonders die juvenile Form der OCD profitiert in den Stadien I und II von einer konservativen Therapie, die jedoch sorgfältig überwacht werden muss (Cahill 1995, Green und Banks 1953, Linden 1977, Van Denmark 1952). Eine operative Refixation erhält bei Kindern und Jugendlichen bessere Werte als bei Erwachsenen und ist erst in Stadien indiziert, wenn die Symptome länger als drei Monate persistieren und die Bildgebung keinen Rückgang zeigt (Cahill 1995). Nach dem Schluss der Epiphysenfugen ist die Wahrscheinlichkeit einer Heilung durch konservative Maßnahmen sehr gering und weiterhin abhängig von der Defektgröße, Tiefe und Lage (Bruns und Steinhagen 2000, Buckwalter und Mankin 1997). Je größer, desto schlechter ist der Erfolg der konservativen Therapie. Rezidive werden in der Literatur nur selten beschrieben.

4.4.10. Verfahren der Knorpelreparatur

4.4.10.1. Transplantation

Die Unfähigkeit des Knorpels, sich spontan oder durch Stimulation zu regenerieren, erforderte die Erforschung weitergehender Therapiemöglichkeiten. Neben der Transplantation osteochondraler Gewebstücke (OCT- osteochondrale Transplantation) aus nichtlasttragenden Arealen, z.B. der Mosaikplastik, wurde die Methode der autologen Knorpelzelltransplantation entwickelt (Abb. 13+15).

4.4.10.2. Die autologe Knorpelzelltransplantation (ACT)

Sie ist erstmals 1989 von Grande et al (Petersen et al. 2003) getestet worden. Knorpel einer nicht lasttragenden Stelle wurde biopsiert, die Knorpelzellen isoliert und in einer Monolayer- Kultur vermehrt. Die Chondrozytensuspension wurde unter einen Periostlappen, der über den Defekt genäht wurde, injiziert (Brittberg et al. 1994, Gaissmaier et al. 1998). Der Defekt füllte sich mit knorpelähnlichem Gewebe. Brittberg et al. (Abb. 13) veröffentlichte erstmals den Erfolg dieser Methode in einer Studie von 23 Patienten. Nachfolgend wurden Studien mit davon abweichenden Ergebnissen veröffentlicht. Die Auffüllung der Defekte erfolgte nur mit hyalinähnlichem- und Fasergewebe und es wurde hauptsächlich Kollagen Typ I gebildet. Peterson et al. hat mittelfristig mehr als tausend Patienten nachuntersucht. Bei 92% der Patienten mit einer

isolierten ACT am Femurkondylus zeigten sich gute bis sehr gute Ergebnisse. Bei mehreren Defekten zeigten 67% der Patienten gute bis sehr gute Erfolge (Minas et al. 2000). Vorteil der Methode ist deren Nutzung bei größeren Defekten ($>4\text{cm}^2$) (Gaissmaier et al. 2003), die den hohen Aufwand und die damit verbundenen hohen Kosten dieser Methode rechtfertigen. Hervorzuheben ist die Kongruenz der Gelenkflächen bei der ACT gegenüber der osteochondralen Transplantation (Giannini et al. 2002, Burkart und Imhoff 2000, Gaissmaier et al. 2003). Nachteilig wirken sich einerseits das große Wundgebiet durch die Arthrotomie und andererseits das Problem der Dedifferenzierung von Chondrozyten in Monolayer- Kulturen aus. Obwohl beschrieben wird, dass sich die Zellen in der bioaktiven Kammer (Abb. 14+15) redifferenzieren (Benya und Schaffer 1982), scheint dieser Prozess bisher nicht ausreichend steuerbar zu sein. Es wird weiterhin vermutet, dass die Verteilung der Chondrozyten ohne Matrixgerüst in der Kammer ungleichmäßig ist (Petersen et al. 2003). Positive Prognosefaktoren der ACT, die für eine gute Zellqualität sprechen, sind hohe Vitalität nach Primärkultur, hohe Kollagen Typ II-Expression und die damit korrelierende Aggrecanexpression. Negativ wirken sich die Expression von Kollagen Typ I, III, X, IL- 1 und Kollagenasen aus. Zur Kontrolle der Qualität haben sich Kollagen Typ I, II und IL- 1 bewährt (DGU/DGOOC et al. 2002). Ferner ist anfangs von einer erheblichen Rehabilitationsdauer zur Matrixreifung auszugehen, die nicht vor 24 Monaten abgeschlossen ist (Burkart und Imhoff 2000, Roberts et al. 2001). Deshalb werden klinisch, kurzfristig, schlechtere Ergebnisse beobachtet, die sich im weiteren Heilungsverlauf verbessern (Erggelet et al. 2002). Das Resultat eines qualitativ hochwertigen Knorpelersatzes wird nur durch phänotypisch stabile Knorpelzellen gewährleistet (Gaissmaier et al. 2003, Dell' Accio et al. 2003). In Biopsien von ACTs wurde bis zu 80% hyalinartiger Knorpel nachgewiesen, dessen Zonengliederung abweichend vom Normalen ist, aber dessen morphologische Zusammensetzung und Festigkeit den hohen Anforderungen von Gelenkknorpel entspricht (Peterson 2002, Roberts et al. 2001, Peterson et al. 2000).

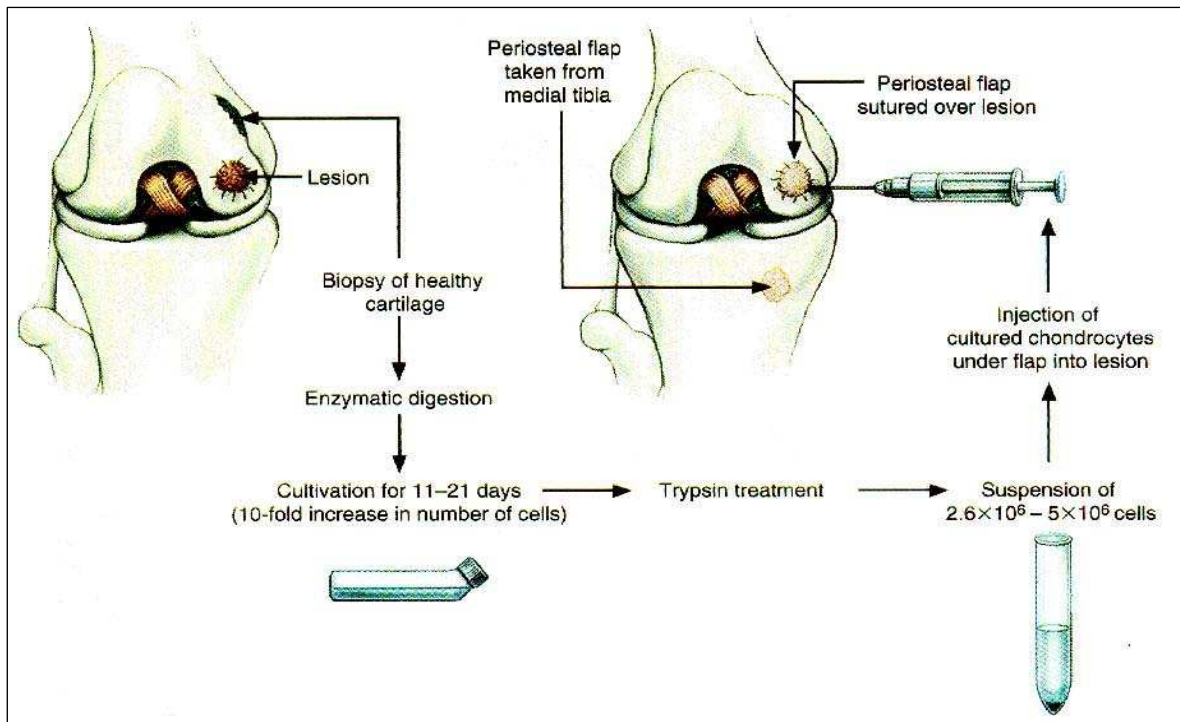


Abb. 13: Ablauf der Autologe Chondrozyten- Transplantation [aus Brittberg et al. (1994)]

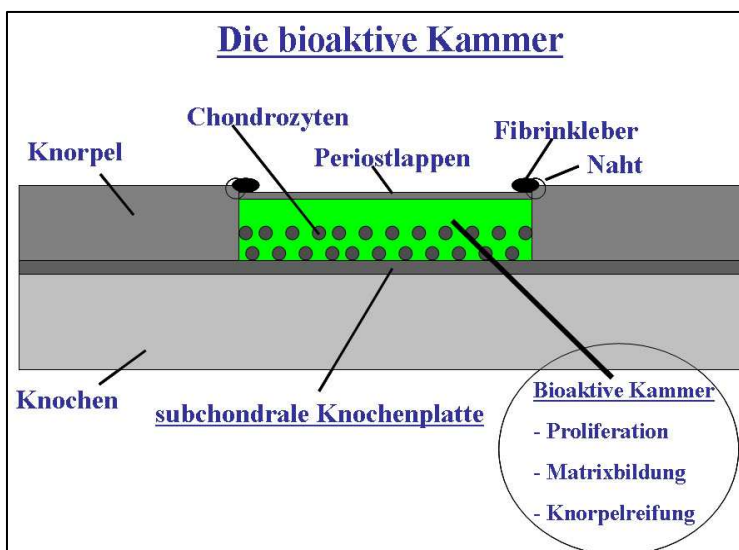


Abb. 14: Die bioaktive Kammer schematische Darstellung (modifiziert nach Erggelet et al. 2000)

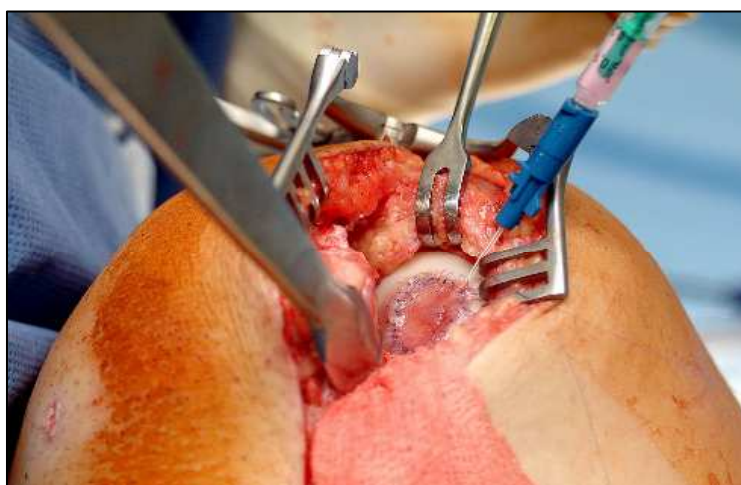


Abb. 15: Operationssitus der bioaktiven Kammer

4.5. Qualitätssicherung von ACT und Tissue Engineering

Die Fachgesellschaften der DGU (Deutsche Gesellschaft für Unfallchirurgie) und der DGOOC (Deutsche Gesellschaft für Orthopädie und Orthopädische Chirurgie) gründeten die Arbeitsgruppe „ACT und Tissue Engineering“, deren Aufgabe es ist, Leitlinien zur Anwendung der ACT auf dem aktuellen Kenntnisstand zu geben und durch Empfehlungen die Weiterentwicklungen auf diesem Gebiet qualitativ zu überwachen. Klinische und wissenschaftliche Erkenntnisse sind die Grundlage für ein Positionspapier, welches Empfehlungen zur Indikation, Operationstechnik, Transplantatqualität, Nachbehandlung und Nachuntersuchungen beinhaltet (DGU/DGOOC et al. 2002). Neben international gültigen Standards ist es das Ziel valide Scores zur Beurteilung der ACT- Ergebnisse von Knorpeldefekten, z.B. bei der OCD zu entwickeln, im Langzeitverlauf das heterogene Bild des Knorpelschadens zu vergleichen und die Qualität der Verfahren neben kommerziellen Anbietern zu kontrollieren.

5. Material

5.1. Geräte

Absaugpumpe	Hirschmann Pipetus
Autoklav	Certoclav Sterilizer GmbH Tischcertoklav Axiolab
Brutschrank	Memmert GmbH inco 2
Eismaschine	Scotsman FRIMON AF 80
Elektrophorese Kammer	Bio-Rad Mini-Sub-Cell ^R GT Gerhardt Thermoshake TH05/THL5
Fluo-S TM MultiImanager	BioRad
Fuchs-Rosenthal Zählkammer	OptikLabor
Histokinette	Shanon Citodel 1000
Kamera	Nikon AF NIKKOR 50mm
Kühlplatte	Leica EG 1130
Microtom	Microm Typ HM 355 und Leica CM 1100
Mikroskop	Zeiss Axiovert 200M und Zeiss Axiovert 25
Paraffinbehälter mit Wärmeplatte	Leica EG 1120
PCR (Polymerase-Chain-Reaktion)Machine	Master Cycler Gradient, Eppendorf
Thermostat plus	Eppendorf
Vortex Gene 2	Scientific Industries
Waage	KERN GS
Wasser-Deionisations/ Filtrieranlage	TKA-LAB Reinstwassersystem Typ HP 6UV/VF
Werkbank	Microflow Microsafe SC
Zentrifugen	Eppendorf 5415D, Eppendorf 5804R, minispin
Zellkulturflaschen	BD- Falcon Zellkulturflaschen, REF 353112 vented cap

5.2. Chemikalien

2-Propanol	Merck I967540046
Agarose	BIO- RAD High Strength Analytical Agarose Control Nr. 161680A
Bromphenol Blau	Merck 1.11746
Chloroform	Merck K29322345
di-Natriumhydrogenphosphat Dihydrat	Merck K28272080
DNA Marker	Carl Roth GmbH pUC19/Msp I Art. Nr. T149.1
Ethanol	Apotheke KIM
Ethidiumbromid (Ethbr.)	Carl Roth GmbH Art. Nr. 7870.1 10mg/ml
Natriumchlorid (NaCl)	Apotheke
Ethylendiamidtetraessigsäure (EDTA)	Merck S05581046
Glycerol	Merck K28649392106
Kaliumchlorid (KCl)	Merck F518033032
Kaliumdihydrogenphosphat (KH ₂ PO ₄)	Merck F900877045
Methanol	Merck K29889143
Osteodec	Manfred Fremdling-Krankenhaus und Laborbedarf. Fürth/Landshut
Trizol	Invitrogen / Life technologies Lot# 1106266
Xylol	Dr. K. Hollborn & Söhne, Leipzig
Ampuwa	Fresenius Kabi
DMEM/ F12:	Gibco/ Invitrogen
Dulbecco`s MEM/NUT MIX F12 1:1 ohne L-Glutamine mit Pyruvat	Cat.No. 21331-020

5.3. Enzyme

Trypsin/ EDTA Solution in PBS [0,05% / 0,02%(w/v)]	BiochromAG Cat.No. L2143
Pronase E (Streptomyces griseus) 4.000.000 PU/g	EC 3.4.24.4 Merck
Kollagenase P (Clostridium lyophilized)	Roche Diagnostics GmbH Histolyticum

5.4. Färbungen

Eosin	Chroma GmbH & Co.
Hämatoxylin nach Gill	Dr. K. Hollborn & Söhne, Leipzig
Safranin- O - Lösung	Dr. K. Hollborn & Söhne, Leipzig
Alkalische Phosphatase	Dr. K. Hollborn & Söhne, Leipzig
Masson- Goldner	Dr. K. Hollborn & Söhne, Leipzig
Xylol	Dr. K. Hollborn & Söhne, Leipzig
Anilinblau	Dr. K. Hollborn & Söhne, Leipzig

5.5. Antikörper

Kollagen Typ I (IgG _{2aκ})	Oncogene TM , Research Products Lot# D12319-1, monoclonal mouse anti- human/rabbit Isotype, 100µg/mL clone I-8H5 (Mayne und Burgeson 1987, Krieg et al. 1985, Weiner et al. 1987, Laurent 1985, Karsenty et al. 1991, de Wet et al. 1983, Barsh und Byers 1981)
Kollagen Typ II (IgG1κ)	Oncogene TM , Research Products Lot# D09565-1 monoclonal mouse anti- human/rabbit/mouse 1µg/mL clone II-4C11 (Ryan und Sandell 1991, Kumagai et al. 1994, Kivrikko 1993, Sandell et al. 1991, Mayne und Burgeson 1987)
Fluoreszenz Antikörper IgG (H+L)	MoBiTec, Lot# F-2761 Fluorescein goat anti- mouse IgG 2mg/mL (Asubel, 1992 #25)
Kontroll- IgG	Calbiochem, Mouse IgG, Serum Lot# B42236 10000 µg/MI
Kollagen Typ X	K.v.d. Mark, Institut für Molekulare Medizin, Universität Erlangen
NBT/BCIP- Stammlösung	Roche Nr. 1681451 (Horwitz et al. 1996, Michal et al. 1983, Wolf 1968, Wolf et al. 1973)
ProLongR Antifade Kit	MoBiTec P-7481 (Taylor et al. 1986, Lougin et al. 1993)

5.6. Test Kits

Omniscript RT Kit

Quiagen Cat#205111

Taq PCR Master Mix Kit

Quiagen Ca#203445

5.7. Primer

Gen	Species	Primer-länge	Accession	Länge PCR Produkt	Annealing Temperatur	Sequenz
GAPDH	hu/bov	20 / 20	BT006893	254 bp	63	upstream:CAT CAC TgC CAC CCA gAA gA downstream:CCT gCT TCA CCA CCT TCT Tg
TGFβ1	hu/ra	20	XM_03090	270 bp mit 2b	56	upstream:Cgg Cag CTg TAC ATT gAC TT downstream:AgC gCA CgA TCA TgT Tgg AC
bFGF2	hu/bo/ra	20 / 20	XM_00330	281 bp	60	upstream:TAC AAC TTC Aag Cag Aag Ag downstream:Cag CTC TTA gCA gAC ATT gg
Col X	hu	21	X98568	423 bp mit 5b	60	upstream:CCT CTT gTT AgT gCC AAC Cag downstream:gAg CCA CTA ggA ATC CTg Ag
IL-1	hu	20 / 20	BC008678	481 bp	60	upstream:AAG Cag CCA Tgg Cag AAg TA downstream:gAA CAC CAC TTg TTg CTC CA
VEGF	hu/rat/mou/rab	18 / 20	AF430806	293 bp	60	upstream:AAG Tgg TCC Cag gCT gCA downstream:ATC TCT CCT ATg TgC Tgg CC
Col I alpha2	hu/bo	20 / 20	XM_02924	470 bp	62	upstream:CTC TgC gAC ACA Agg AgT CT downstream:ATC TTC ACC AgC CTT gCC Ag
Col I alpha2	hu/ra	20 / 20	D49399	516 bp	63	upstream:CCC AAg gAC TAT gAA gTC gA downstream:ACA TCA TTg gAg CCC TgC Ag
Col 2B	hu	21 / 22	X16711	106 bp	63	upstream:CAA CAC TgC CAA CgT CCA gAT downstream:CTg CTT CgT CCA gAT Agg CAA T
BMP-7	hu	18 / 21	XM030621	500 bp	55	upstream:CAA TCT CCg TCC TCT ACT downstream:TTT TCC TTT CgC ACA gAC ACC
Aggrecan	hu	20 / 20	NM_01322	110 bp	55	upstream:ACT TCC gCT ggT CAg ATg gA downstream:TCT CgT gCC AgA TCA TCA CC

Tab. 2: Darstellung der untersuchten Gene und die dazu verwendeten Primersequenzen, Spezifikation des verwendeten Genmaterials

5.8. Verbrauchsmaterialien

Objektträger

Superfrost Plus, beschichtet, Menzel

Paraffin

Paraplast Plus, Merck

Stickstoff

Linde

5.9. Computersoftware

Photobearbeitung	Adobe Systems, Inc. Adobe Photo Shop 4.0
Diagramme	SigmaPlot 2001 for Windows Excel 2003
Literaturverwaltung	EndNote 4.0 ISI Research Soft USA
Mikroskopsteuerung	Axiovert Vision 3.0 Carl Zeiss Vision
Quantifizierungsprogramm für Gele	Quantity One® Quantitation Software V 4 BioRad

5.10. Patientendaten

OCD- Gesamt	ID/OCD/ Gesamt +Histo	Sex	Alter in J	Größe in cm	Körper- gewicht in kg	BMI	Defekt- größe	ORCS- Klassifi- kation	Lokali- sation	Besch- werde- dauer in J	Vor- OP- s	zusätz- liche Schä- den	gegen überl. Seite	Histo(H) Immunhi- sto (I) PCR (P)
	BP87	m	15	183	79	24	6	IVb	re.med. FC	2	3	nein	OCD	H,I,P
	EM84	w	19	158	47,5	19	2,6	III	re.med. FC	5	2	nein	o.B.	H,I,P
	GG55	w	47	171	79	27	5	III	li.med. FC	1	0	nein	o.B.	H,I
	GT68	m	34	191	93,5	26	8,5	IV	li.med. FC	10	0	nein	o.B.	H,I,P
	HS75	m	27	173	60	20	3	III	re.med. FC	5	2	nein	o.B.	H,I,P
	HS81	m	22	172	60	20	15	III+ IV	li.med. +lat.FC	9	1	IMVH, VKB	o.B.	H,I,P
	KU47	m	55	171	85	29	3	III	li.lat.FC	0,2	0	IMVH	o.B.	H,I
	ML57	w	46	172	77	26	4	IV	re.med. FC	0,25	0	nein	o.B.	H,I,P
	PR81	m	21	179	133	42	15	IV	li.med. FC	2	2	nein	nicht o.B.	H,I,P
	RJ97	m	7	125	23	15	1	II	re.med. FC	1	0	nein	0	H,I
	SD81	m	21	166	85	31	5	IV	li.med. FC	3	2	nein	o.B.	H,I,P
	SD82	m	20	185	78	23	4,5	IVb	li.med. FC	10	3	nein	o.B.	H,I,P
	SM71	m	31	184	112	33	16	IV	li.med. FC	2	1	nein	o.B.	H,I
	SN82	m	21	172	108	37	1,5	IV	re.med. FC	10	2	VKB Elongat	o.B.	H,I,P
	WD78	m	25	189	85	24	6	IV	li. retro- patellar	0	0	Patellalux med.Reti- neculum	o.B.	H,I
	Mittel- wert	m:12 w:3	27	172,7	80,33	26	6,41			4,03	1,2			
	Stabw		13	15,97	26,72	7	4,99			3,88	1,1			

Tab. 3: Patientendaten der OCD- Gruppe

Trauma- Gesamt	ID/ Trauma/ Gesamt	Sex	Alter in J	Größe in cm	Körper- gewicht in kg	BMI	Defekt- größe	ORCS- Klassifi- kation	Lokali- sation	Besch- werde- dauer in J	Vor- OP- s	zusätz- liche Schä- den	gegen überl. Seite	Histo(H) Immunhi- sto (I) PCR (P)
	BF85	w	17	165	65	24	3,5	IV	li.lat.FC, retropat- ellar	4	0	VKB, IM	o.B.	H,I,P
	BJ79	w	23	164	58	22	6	IV	li.med. FC	0,1	2	VKB, IM	o.B.	H,I,P
	DM73	m	29	184	85	25	5	IV	re.med. FC	2	2	IM	nicht o.B.	H,I,P
	FM87	w	15	167	77	28	3	IV	re. retropat- ellar	1	0	nein	o.B.	H,I,P
	GA69	m	34	185	86	25	7,5	IV/ III/ II	li.lat-med FC retropatell- ar	1	1	VKB, IMVH,+ IMHH	o.B.	H,I,P
	HS73	m	30	178	100	32	7,5	IV	li. retropat- ellar	0	1	Patella dyspla- sie	o.B.	H,I,P
	HS84	m	19	180	73	23	1,5	III	li. retropat- ellar	0	0	nein	o.B.	H,I
	HT71	m	32	183	88	26	3	IV	re.med. FC, retropat- ellar	0	0	nein	o.B.	H,I,P
	JM26	w	76	162	65	25	1,5	III	li.med.Ta- lus	1	2	nein	o.B.	H,I
	KH60	w	42	167	64	23	6	IV	li.med. FC	3	2	IM	o.B.	H,I,P
	LE76	m	26	194	100	27	4	IV	re.lat. FC	0,25	1	nein	o.B.	H,I
	LN88	m	15	186	76	22	5	IV	li.lat.FC	0	0	nein	o.B.	H,I,P
	PH60	m	42	178	82	28	4	III	re.med. FC	0	0	VKB, IM, AM	o.B.	H,I
	RM84	m	18	180	100	31	5	III	re.med. FC	0,25	0	nein	o.B.	H,I
	TA74	m	28	173	75	25	5	IV	re.med. FC	0	1	VKB	o.B.	P
	UL53	m	49	154	69,3	29	1	IV	li. retropat- ellar	4	0	Patella laterali- sation	o.B.	H,I
	Mittel- wert	m: 11 w: 5	30,94	175	78,96	26	4,28			1,04	0,8			
	Stabw		16	10,83	13,45	3	1,98			1,44	0,9			

Tab. 4: Patientendaten der Trauma- Gruppe

6. Methoden

6.1. Diagnostik

6.1.1. MRT

Bei allen Patienten wurde mittels MRT eine Osteochondrosis dissecans (Abb. 11) verifiziert. In der Verlaufskontrolle nach der Knorpeltransplantation ist das MRT ein wichtiger Parameter, weil es die beste, nichtinvasive, Beurteilung des Knorpels darstellt.

6.1.2. Arthroskopie

Die Arthroskopie ist mit der Möglichkeit einer gleichzeitigen Therapie gekoppelt. Neben der Defektbeurteilung, d.h. Größe, Tiefe und der Grenze zum Gesunden, können weitere Schäden des Knieinnenraumes verifiziert werden und eventuelle Dissekate entfernt werden. Hierbei erfolgt die objektive Einteilung des Knorpelschadens in Stadien, z.B. Klassifikation nach Outerbridge (Abb.12) und ICRS.

6.2. Entnahme von Knorpel und Verarbeitung artikulärer Chondrozyten

Zur Durchführung der ACT (Brittberg et al. 1994) sind grundsätzlich zwei Operationen des Patienten (Abb. 13+15) notwendig. Während in der ersten Operation die Indikationsstellung zur ACT erfolgt, wird arthroskopisch Knorpelmaterial aus dem interkondylären Notchbereich entnommen und in einem zweiten operativen Eingriff, nach ca. zwei Wochen, die Transplantation der Knorpelzellsuspension vorgenommen. Die Entnahme des Knorpelgewebes erfolgt mittels Trephine oder Luer. Unmittelbar nach der Entnahme der Knorpelbiopsien werden diese unter sterilen Bedingungen in Falcon- Flaschen mit Nährlösung überführt und verschlossen. Zeitgleich werden dem Patienten intraoperativ ca. 150ml Blut entnommen, welches zu Serum verarbeitet wird und als Mediumzusatz für die Zellanzucht essentiell ist. Das Dissekat besitzt in dieser Arbeit molekularbiologisch und zellbiologisch einen besonderen Stellenwert. Während der Diagnosestellung durch die Anamnese, Röntgen, MRT und der Verifizierung durch die Operation werden eventuell Corpora libera (freie Gelenkkörper) (Abb. 10a) oder ein Dissekat in situ beschrieben, was zur intraoperativen Entfernung führt. Diese Knorpel- bzw. Knorpel-Knochen -Fragmente werden ebenfalls steril in Röhrchen mit Nährlösung gegeben und erfahren die gleichen

Prozeduren wie die Chondrozyten aus dem interkondylären Notchbereich. Auf diese Weise kann ein Vergleich zwischen dem Dissekat und den „gesunden Knorpelzellen“ der Notch erfolgen.

6.2.1. Isolation der Chondrozyten

Die zerkleinerten Gewebstücke werden unter Sterilfiltration mit DMEM / F12 (1ml pro 0,1mg Gewebe) versetzt. Der mechanischen Zerkleinerung des Gewebes folgt eine enzymatische Proteolyse. Das Medium wird abgesaugt, die Knorpelstücke werden in ein Dreihalsgefäß mit integriertem Magnetrührer überführt und es wird ein Pronaseansatz (1mg Pronase pro ml SFM) dazugegeben, der die extrazelluläre Matrix abbaut. Mit leicht geöffnetem Deckel verbleibt die Lösung eine Stunde bei 37°C mit einem CO₂ – Gehalt von 5% im Wärmeschränk. Anschließend erfolgt die Waschung mit PBS. Dazu wird das Medium abgesaugt und durch NaCl ersetzt. Nach kurzem Schwenken wird es erneut abgesaugt und wiederholt. Für den Kollagenaseverdau wird DMEM / F12 (1ml/0,1mg) mit Serum (5%) unter Sterilfiltration zur Lösung hinzugefügt und mit Kollagenase (0,1mg/ml Medium) in ein Rührgefäß gegeben. Bei leicht geöffnetem Deckel, 37°C und 5% CO₂ wirkt die Kollagenase 24 Stunden auf das Gewebe ein. Die trübe Suspension wird in sterile Röhrchen überführt und bei 1500 rpm 6 Minuten lang zentrifugiert. Bei klarem Überstand wird dieser abgesaugt, das erzeugte Zellpellet dreimal mit PBS gewaschen und suspendiert. Entsprechend der Zellzahl werden die Zellen in serumhaltiges Medium aufgenommen und in Zellkulturflaschen ausgesät.

6.3. Zellkultur

In spezifischen zertifizierten Kulturmedien mit 10% autologem Serum werden die Chondrozyten bei 37°C und 5% CO₂ – Gehalt im Brutschrank inkubiert (Abb.16). Es wird regelmäßig durch frisches Medium ersetzt, um die Expansion nicht zu gefährden, wenn der Indikator bei Veränderung des pH- Wertes dies anzeigt. In einer zweidimensionalen

Matrix proliferieren die Zellen bis sie nach ca. 14 Tagen „geerntet“ werden. Visuell werden die Zellen durch ein Mikroskop im Phasenkontrast auf Zellform, Zelldichte und Vitalität kontrolliert, um den Kriterien der Qualitätssicherung gerecht zu werden. Die Zellsuspension wird mit Trypsin / EDTA von der Oberfläche der Zellkulturflasche

abgelöst, in das Transplantatmedium aufgenommen und in ein steriles Röhrchen überführt (Abb. 16e). Ein Aliquot dient der Objektivierung der Zellzahl, Vitalität sowie der Qualitätskontrolle mittels RT-PCR. Kann die Reimplantation nicht zum geplanten Zeitpunkt stattfinden, z.B. keine OP-Fähigkeit, Entzündung oder andere Erkrankungen des Patienten so erfolgt die Aufbewahrung der Zellen in flüssigem Stickstoff

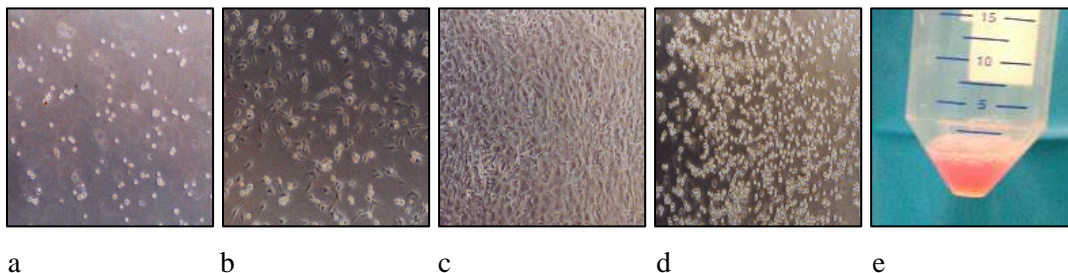


Abb. 16: Zellkultur a) Chondrozyten nach Isolierung b,c) Chondrozyten während der Zellkultur und Proliferation, d) Chondrozyten vor ACT e) in Suspension (Bilder M. Aurich)

6.4. Zellzählung

Mittels der Fuchs Rosenthal Zählkammer werden die Zellen ausgezählt. Ein Tropfen der aliquotierten Zellsuspension wird über das Zählnetz der Zählkammer pipettiert und danach durch ein planparalleles Deckglas fest auf die Seitenstege gepresst, so dass ein Raum von konstant 0,1mm Höhe entsteht. Die Zählnetze bestehen aus neun Quadraten zu je 1mm^2 , die sich noch einmal in Kleinstquadrate unterteilen. Ausgezählt werden 16 derartige Kammern. Die Berechnung der absoluten Zellzahl wird nach folgender Formel berechnet und ergibt nachfolgende Werte:

$$\text{Gesamtzellzahl} = \text{ANZAHL in 16 Kammern} \times 5000 \times \text{Volumen [ml]}$$

Zur Berechnung der Generationszahl, wird folgende Formel verwendet.

Generationszahl n :

$$n = \frac{\lg N - \lg N_0}{\lg 2}$$

6.5. Reimplantation

Ziel der ACT ist die fehlenden zellspezifischen Proliferationen im Bereich des Defektareals über Vorläuferzellen durch in vitro Stimulierung und Wachstum von autologen Chondrozyten und deren Replantation zu kompensieren. Normalerweise wird der Defekt, der Kontakt zum subchondralen Knochen besitzt, mit einem fibrösen,

minderwertigen Ersatzgewebe aufgefüllt, denn immigrierende Zellen aus dem Knochenmark induzieren eine Defektheilung, die den biomechanischen Ansprüchen eines Gelenkknorpels nicht entsprechen. Oberflächliche Defekte werden i. d. R. nicht ersetzt. Die durch ACT zwangsangesiedelten vitalen Zellen haben die Aufgabe der Synthese und Sekretion knorpelspezifischer Matrixproteine, um das Defektareal hochwertig zu rekonstruieren.

6.6. Molekularbiologie

6.6.1. Herstellung von Puffern und Lösungen

Für die Zellkultur humaner Chondrozyten wurden entsprechende, im Handel erhältliche, Fertiglösungen verwendet, damit den hohen qualitativen Anforderungen im Umgang mit dem kostbaren Material Rechnung getragen werden konnte.

Selbst hergestellte Puffer und Lösungen fanden ihre Anwendung bei Proben, die der Reimplantation nicht zugeführt wurden, sondern als Qualitätskontrolle verwendet wurden.

F12: 10,636g F12 + 1,170g NaHCO_3 werden mit reinstem Wasser bis aufgefüllt bis zum pH:7,4. Danach wird pro Liter Medium 0,5-1ml Gentamycin dazugegeben und steril filtriert. Lagerung bei 4°C.

DMEM: 13,42g DMEM + 3,7g NaHCO_3 mit reinst. Wasser auffüllen, pH:7,4 und Gentamycin dazu 0,5-1ml/1lMedium, Sterilfiltration und Lagerung bei 4°C

PBS (Phosphatgepufferte Saline) Puffer(1l) für Zellkultur pH 7,4:

8g NaCl; 1,18g Na_2HPO_4 ; 0,2g KCl; 0,2g KH_2PO_4 ; Autoklavieren bei 125° für 20 Minuten

Trypsin: 2mM EDTA in PBS gelöst, pH 7,25 einstellen, danach Zugabe von 0,05% Trypsin (50mg/100ml), steril filtrieren in einem 0,2µm Filter, Lagerung bei -20°C

Pronase und Kollagenase-Lösung für den Verdau

0,1%Pronase = 1mgPronase /1ml serumfreies Medium

0,01% Kollagenase = 0,1mg/ml Medium+5% Serum

Sterilfiltration mittels 0,2µm Filter

TBE 5fach Puffer für Elektrophorese:

0,5 mol Tris (60,57g) + 10 mmol EDTA- Na_2 (3,72g) + 0,5mmol H_3BO_3 (30,92g) + a.d auf 1l aufgefüllt.

10 x Loading- Puffer: 4mg Bromphenol-Blau; 0,5ml Glycerol; 0,5ml 1x TBE-Puffer, 0,5µl EthBr (0,5µg/ml)

Elektrophorese Puffer: 300ml 5xTBE + 15µl EthBr (0,5µg/ml)

6.6.2. PCR

6.6.2.1. RNA - Extraktion

Im ersten Schritt der Homogenisation bzw. Phenolextraktion werden die, sich im Medium befindlichen, Zellen 3 Minuten bei 1500 rpm und Raumtemperatur (Eppendorf Zentrifuge 5415D) zentrifugiert. Danach wird das Medium vorsichtig abpipettiert, so dass das Zellpellet nicht verloren geht. Mit 0,5 ml Trizol (Raumtemperatur) wird das Pellet, durch mehrmaliges auf- und abpipettieren, herausgelöst. Unter Verwendung von TRIZOL® Reagent (Invitrogen) kann die gesamte RNA von Zellen und Geweben isoliert werden (Ausubel et al. 1990 und 1992, Bracete et al. 1998, Chomczynski und Sacchi 1987 und 1993, Fox 1998, Simms et al. 1993, Wilfinger et al. 1997). Durch Zugabe von 100µl Chloroform, kurzem Schütteln und einer anschließenden fünfzehnminütigen Zentrifugation bei 4°C und 1200x g erfolgt die Phasentrennung in eine wässrige, eine organische Phase und eine Interphase. Die zu isolierende RNA befindet sich in der wässrigen Phase, die in der Isopropanolfällung mit einer Pipette abgenommen, in ein neues Tube aufgenommen und mit 0,25ml Isopropanol versetzt wird, sowie 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und 10 Minuten bei 4°C und 12000 x g zentrifugiert wird. Auf diese Weise erfolgt die Präzipitation. In der anschließenden Ethanol-fällung wird der entstandene Überstand vorsichtig abpipettiert und das Pellet mit 0,5ml 75%igem Ethanol (in Ampuwa/ Fresenius Kabi) gewaschen. Dazu wird die Probe gevortext. Nach fünfminütiger Zentrifugation bei 4°C und 7500 x g wird der Ethanolüberstand abgenommen. Die Lösung der RNA erfolgt nach Entfernung des Ethanols der 5-10 minütigen Trocknung des Pellets und der nachfolgenden Lösung in 25µl reinstem RNase - freiem Wasser (RNase – freies Wasser und 0,01% DEPC) oder 0,5% SDS. Die isolierte Gesamt - RNA ist frei von Proteinen und DNA und eignet sich nachfolgend zur weiteren Analyse.

6.6.2.2. Reverse Transkription

RNA kann nicht direkt als Template für die Amplifikation benutzt werden. Zuvor muss die RNA in eine komplementäre DNA (cDNA) über den Prozess der reversen Transkription umgeschrieben werden. Dafür sind spezifische RTasen (RNA abhängige DNA – Polymerasen) notwendig. Vorteil der RT-PCR ist die hohe Sensitivität gegenüber weiteren RNA – Nachweismethoden (z.B.: Northern Blot, in – situ – Hybridisierung). Folgendes Two Step - RT – PCR Protokoll wurde verwendet: Im Anschluß an eine Denaturierung des Templates (6 Minuten bei 65°C) und der sofortigen Lagerung der Probe auf Eis, erfolgt eine Inkubation von 25µl RNA Probe zusammen mit 4µl 10xRT Buffer (Omniscript™ RT Kit (200)Quiagen), 4µl dNTP Mix (1mM/dNTP), 4µl Oligo dT(Primer), 2µl RNase Inhibitor, 2µl reverse Transkriptase und 4µl H₂O reinst bei 37°C / 60 Minuten. Der RNase Inhibitor wird in einer Stammlösung wie folgt zusammengesetzt: 2,5µl RNase Out (Omniscript™) + 1µl RT Buffer (Omniscript™) + 6,5µl RNase freies H₂O. Die entstandene cDNA wird zur Durchführung der PCR aliquotiert.

6.6.2.3. RT- PCR

RT – PCR wird durch die reverse Transkription und die Amplifikation beschrieben. Unter optimalen Bedingungen können in vitro bis zu 10¹² Amplifikate produziert werden. Voraussetzungen ist ein doppelsträngiger cDNA – Strang mit freiem 3'-OH – Ende. Die PCR gliedert sich in drei Phasen. Als erstes erfolgt eine Denaturierung der DNA in ihre Einzelstränge, die während des ersten Zyklus, aufgrund der Komplexizität der DNA – Struktur und der GC - Sequenzen, ca.5-10 Minuten dauert. Danach bindet der Primer (Tab. 2) bei seiner spezifischen Temperatur an die komplementäre Stelle (Annealing). Bei Zugabe von Primern, die an sense – Strang und antisense – Strang binden, kann während eines jeden Zyklus die DNA temperaturspezifisch verdoppelt werden, so dass die PCR zu einer exponentiellen Amplifikation führt. Gemäß dem Temperaturoptimum der hitzestabilen Taq – Polymerase wird die Temperatur auf 72°C erhöht und es kommt zur Verlängerung (Extension) der Oligo- (dT)-Primer bis zur Synthese des kompletten Stranges. Als Ergebnis zeigen sich neu gebildete Doppelstränge, die eine erneute Denaturierung bei 95°C erfordern, die allerdings nur 30 Sekunden andauert, weil komplexere, hochmolekulare Strukturen während des ersten Zyklus verloren gegangen sind. Für optimale Ergebnisse sollte die PCR 30- 35 Zyklen betragen.

Folgendes Protokoll (Tab. 5) wurde verwendet:

Ansatz: 12,5µl Master Mix (1,25U HotStarTaq DNA Polymerase, 1x PCR Puffer (enthält 1,5mM MgCl₂, 200µM je dNTP), 9,5µl H₂O und je 1µl (20pmol/µl) Primer a und b, 1µl cDNA Template. Für die GAPDH humaner Proben wird eine 1:10 Verdünnung der cDNA durchgeführt. Das Standardprotokoll umfasst 30 Zyklen:

Programm PCRTAQGR	Temperatur	Dauer
Denaturierung	95°C	3min
Denaturierung	95°C	30sec
Annealing-variabel	65°C	45sec
Gradient-variabel	10°C	
Elongation	72°C	45sec
GOTO 2		REPEAT 30
Final Elongation	72°C	10min
HOLD	4°C	

Tab. 5:
Protokoll der RT- PCR mit dem
eppendorf Mastercycler gradient

6.6.2.4. Gelelektrophorese

Herstellung Agarose- Gel:

Für ein 3%iges Gel werden 75ml TBE- Puffer und 2,25g Agarose in einem Erlmeyerkolben in der Mikrowelle kurz aufgeköcht, im Anschluß daran mit 3,75µl EthBr versetzt und in eine Mini- Gel- Form gegossen. Bei Verwendung von Ethidiumbromid, zur Färbung von DNA Proben, die gelelektrophoretisch getrennt wird, liegt in Agarosegelen die Nachweisgrenze für DNA bei 5ng. Das sehr starke Mutagen legt sich zwischen die Basen der Nucleinsäuren und ist mit entsprechenden Vorsichtsmaßnahmen zu verwenden. Durch UV- Licht – Anregung kann der Nucleinsäure- Ethidiumbromid- Komplex mit einer Kamera dargestellt und in spezifischen Programmen ausgewertet werden.

Elektrophorese:

Die Elektrophoresekammer wird mit 300ml Elektrophorese- Buffer sowie 15µl EthBr gefüllt und das Gel hineingelegt, so dass es leicht von 1xTBE- Puffer bedeckt ist.

Je Probe werden 3µl Loading Buffer und 10µl DNA auf steriles Papier aufgetragen und in der Pipettenspitze durch vorsichtiges auf und abpipettieren gemischt. Anschließend wird die Probe in die Geltasche überführt. Gleichzeitig werden 5µl des Markers ML puc 19 mit 1,5µl Loading Buffer versetzt und in die letzte äußere Geltasche appliziert. Der Loading Buffer (10X) enthält 0,004g Bromphenolblau + 0,5ml Glycerol + 0,46ml 1xTBE Puffer + 0,5µl EthBr. Der Auftragspuffer erhöht die Dichte der DNA- Lösung, damit sie beim

Auftragen der Proben in die Geltaschen absinkt. Zusätzlich wird Bromphenolblau, als farblicher Marker der Wanderungsgeschwindigkeit, verwendet. Bei dem Anschluß der Elektrophoresekammer an den Strom ist die Laufrichtung der DNA in Richtung Anode zu beachten, weil die Nucleinsäuren, relativ pH- Wert unabhängig, negativ geladen sind. Bei 100V/400mA wandert in 70- 80 Minuten die DNA, abhängig von ihrer Größe durch die Poren des Gels. Der Marker dient als Qualitätskontrolle für die Darstellung der DNA und der Semiquantifizierung.

6.6.2.5. Photographie und Auswertung der Gelbilder

Die Auswertung erfolgt mit einem speziellen Programm (Quantity One[®] Version 4 von Bio Rad), welches das Gel mit einer Kamera fotografiert und der Bearbeitung zuführt.

Die Auswertung kann einerseits durch die optisch- deskriptive Beurteilung unter Beachtung der individuellen GAPDH- und der MLpuc19- Marker- Signalstärke des photographierten Geles erfolgen und andererseits rechnerisch- numerisch durch Extrapolation wie im folgenden Beispiel. Nachdem für jede Bande des Gelbildes ein gleich großes Areal ausgemessen und der entsprechende Hintergrund manuell subtrahiert wurde, erhält man die Nettoausbeute der Signalstärke in Form von Counts, die die Berechnungsgrundlage darstellen. Für die Banden des Markers MLpuc19 wurden die Signalstärken (Counts) ermittelt (Tab. 6) und nach der polynomischen Formel $f = y_0 + ax + bx^2 + cx^3$ extrapoliert (Abb. 17).

MLpuc19							
mol mass (bp)	501	404	331	242	190	147	111
Counts	965	470	380	303	223	185	205

Tab 6:
Beispiel der Signalstärke der Banden
des Markers MLpuc19

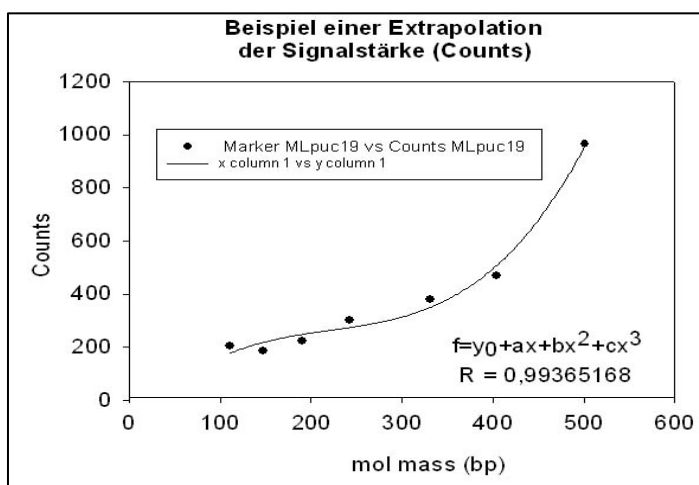


Abb. 17:
Extrapolation der Signalstärke,
verwendet wurden die
Werte der Tab. 6

Wegen der Abhängigkeit der Signalstärke bzw. Fluoreszenz des angelagerten Puffers von der Länge des jeweiligen DNA- Abschnittes müssen die Counts in Abhängigkeit der Molmasse verrechnet werden. Aus diesem Grunde erfolgt für die Transkripte eine Berechnung, die die Singnalstärke bzw. Counts der entsprechenden Molmasse extrapoliert und davon die, von der Kamera detektierte Signalstärke des spezifischen Transkripts dividiert. Die Verhältnisse der Basenpaare zu den entsprechenden Counts werden beispielhaft in Tab. 7 dargestellt.

Transkripte	Col-II	Aggrecan	GAPDH	TGF- β	bFGF	Col-X	Col-I	IL-1	BMP-7
mol mass (bp)	106	110	254	270	281	423	470	481	500
Counts	170	176	280	289	298	571	770	835	945

Tab. 7: Beispiel extrapolierter Werte für die Transkripte, Berechnungsgrundlage der im Gel verwendete Marker MLpuc19

Der berechnete Faktor ergibt semiquantitativ, aufgrund des fehlenden quantitativen Nachweises, eine Transkriprate, deren Normierung am Housekeeping- Gen GAPDH erfolgen muss, damit der Vergleich aller Proben untereinander möglich ist. Infolgedessen werden die Faktoren der entsprechenden Transkriptmengen durch die der GAPDH geteilt. Deshalb sind alle RT- PCR- Daten (Tab.7) im Verhältnis zur GAPDH zu bewerten und auf die Produktlänge korrigiert.

6.6.2.6. Vergleich semiquantitative und quantitative PCR

Der semiquantitative Auswertungsmodus wurde ausgewählt, aufgrund der fehlenden Verfügbarkeit der quantitativen PCR, sowie der nicht unbegrenzten Ressourcen von Knorpelzellen. Stichprobenhaft wurden nach Abschluss der Experimente einzelne Proben der quantitativen PCR zugeführt, um die semiquantitative Methode zu validieren.

6.7. Histologie

6.7.1. Gefrierschnitte

Eine auf Trockeneis gelagerte Silberfolie wird mit Tissue Tek versetzt. Das Knorpelstückchen wird auf die sich abkühlende Masse gelegt und anschließend mit einem weiteren Tropfen Trägermedium vollständig eingeschlossen. Die nun feste Probe wird bei

-80°C im Gefrierschrank gelagert. Zum Schneiden wird ein Microtom verwendet, dessen Kühlkammer zuvor auf -27°C abgekühlt wurde. Die geschnittenen Präparate (3-10µm Dicke) werden auf einen Objektträger aufgezogen und mindestens 24 Stunden Ruhezustand belassen. Danach kann die Färbung erfolgen.

6.7.2. Paraffinschnitte

Zur Einbettung in Paraffin (Paraplast) werden die Knorpelstückchen in 1% Paraformaldehyd 6 Stunden fixiert und mit Osteodec® 24 Stunden entkalkt. Die Präparate werden nach einem kurzem Spülvorgang mit a.d. in einer Serie von Waschschritten in einer aufsteigenden Ethanolreihe (70%, 70%, 96%, 96%, 96%, 100%, 100%), Ethanol-Xylol Gemisch (1h 2:1/1h 1:2) und reinem Xylol behandelt. Es folgen zwei abwechselnde Tauchbäder in geschmolzenem Paraffin für 2 bzw. 3 Stunden und eine Lagerung im Brutschrank (60°C) für 30 Minuten. Abschließend werden die Gewebestücke in Kunststoffbehälter eingegossen und bei -20°C gelagert. Die Schnitte werden bei 60°C auf die beschichteten Objektträger eingeschmolzen.

Zur Entparaffinierung werden die Schnitte in einer Serie von Waschschritten rehydriert. Beginnend mit zwei Waschungen in reinem Xylol zu je 30 Minuten, gefolgt von einer absteigenden Ethanolreihe (100%, 100%, 96%, 96%, 70% je 5 Minuten) und einer anschließenden Spülung in destilliertem Wasser wird das Präparat in ein anorganisches Milieu überführt.

6.7.3. Puffer und Lösungen

PBS (Phosphatgepufferte Saline) Puffer (1l) pH:7,4: 8g NaCl; 1,18g Na₂HPO₄; 0,2g KCl; 0,2g KH₂PO₄; Autoklavieren bei 125° für 20 Minuten

Tris- Puffer/ TBS (0,1M): pH 9,5; 0,05M Tris, 0,05M MgCl₂; 0,1 M NaCl

Albuminpuffer: 0,5g Albumin; 16,6ml TBS; 0,1% Na-acid

Hyaluronidase: 0,0015g auf 15ml PBS

6.7.4. Färbungen

6.7.4.1. Hämatoxylin- Eosin

Die Schnitte werden 10 Minuten in eine Glasküvette mit Hämatoxylin gestellt und mit Wasser abgespült. In 5-10 Minuten erfolgt mit lauwarmem Leitungswasser das Bläuen. Im Anschluss daran werden die Schnitte 10 Minuten mit Eosin inkubiert. Überschüssige Farbreste werden durch eine Spülung mit Wasser beseitigt. Hämatoxylin färbt die Kerne dunkelbraun, währenddessen Eosin das Bindegewebe rot- bläulichrot anfärbt.

6.7.4.2. Safranin – O/ Lichtgrün

Die Objektträger werden in Färbeküvetten, die mit einer Safranin- O- Lösung versehen sind, für 5-10 Minuten gelagert. Anschließend wird mit Aqua deion. überschüssiges Safranin – O abgespült. Der zweite Schritt bezweckt die Färbung mit Lichtgrün und dauert 10-15 Minuten. Diese Färbung dient der Darstellung der unstrukturierten Grundsubstanz des Knorpels. Die Vorteile sind, der lichtmikroskopische rote Kontrast der Proteoglykane, das gute Eindringen in das Gewebe und die stöchiometrische Bindung an saure Valenzen (Romeis 1989). Letzteres ermöglicht eine quantitative Abschätzung der sauren Substanzen, d.h. der Proteoglykane (Rosenberg 1971). Die Kollagene sind lichtgrün gefärbt. Weiß erscheinende Areale sind weniger gehaltvoll an Proteoglykanen, d.h. sie haben ca. 50% weniger Proteoglykan.

6.7.4.3. Masson- Goldner

Diese Färbung ist die Weiterentwicklung der Masson`schen Trichromfärbung durch Goldner. Statt Lichtgrün wird hier Anilinblau verwendet. Das Präparat wird 10 Minuten mit Weigerts Eisenhämatoxylin gefärbt, danach folgt das Abwaschen mit Leitungswasser, die 10minütige Färbung mit Säurefuchsin- Ponceau, das Schwenken in 1%iger Essigsäure, die 10minütige Färbung mit Phosphormolybdänsäure- Orange- G, das erneute Schwenken in 1%iger Essigsäure und letztlich der 10 minütigen Färbung mit Anilinblau. Abschließend wird mit Aqua deion. gespült. Die ECM wird dabei orangegelb angefärbt, Bindegewebe blau, Zytoplasma rot und die Kerne bräunlich- schwarz.

Nachbehandlung der Färbungen:

In einer aufsteigenden Alkoholreihe (70%- 96%- 96%- 100%- 100%) und einer folgenden Xylolwaschung (2x 10 Minuten) erfolgt die Überführung der Präparate in ein organisches Milieu. Danach kann das Präparat mit Canada Balsam eingedeckt werden.

6.7.5. Immunhistochemie

6.7.5.1. Alkalische Phosphatase

Zum Nachweis der alkalischen Phosphatase wird der Substratumsatz des Enzyms dargestellt. 10 ml 0,1M Tris- Puffer (pH 9,5; 0,05M $MgCl_2$; 0,1 M NaCl) und 200 μ l Stammlösung (NBT/BCIP Stock Solution – Roche Diagnostics GmbH) werden gemischt und auf den Objektträger gegeben. In der Indigogenmethode stellt BCIP (5-Brom-4Chlor-3-indolyl-phosphat, Toluidinsalz in 67% DMSO) das AP-Substrat dar und wird nach seiner Dephosphorylierung zu einem blau- schwarzen Indigofarbstoff oxidiert (Junqueira und Caneiro 1996). NBT (Nitroblautetrazoliumchlorid) verstärkt und beschleunigt diese Farbreaktion. Bei 37°C sollten die Präparate 10 Minuten im Brutschrank verbleiben, um danach 5 Minuten in Aqua deion. gelegt zu werden. Zum Trocknen werden sie bei 60°C auf eine Wärmeplatte gelegt. Das Deckgläschen wird mit Eukitt in Xylol / Kanadabalsam bestrichen und auf den Objektträger gelagert. Die Präparate bleiben auf der Wärmeplatte und können nach ca. vier Stunden unter dem Mikroskop betrachtet werden.

6.7.5.2. Kollagen Typ I, II und X

Zum Nachweis der Kollagene vom Typ I, II und X dient die Immunhistochemie. In der indirekten Nachweismethode bindet ein monoklonaler Antikörper an das jeweilige Kollagen und wird über einen fluoreszenfarbstoffkonjugierten Antikörper gegen den Primärantikörper detektiert (Noll und Schaub- Kuhnen 2000). Der Objektträger wird 10 Minuten mit PBS gewaschen. Der in Albuminpuffer (0,5g Albumin; 16,6ml TBS; 0,1% Na-azid) verdünnte erste Antikörper wird 30-60 Minuten auf dem Präparat inkubiert und dreimal mit PBS gewaschen, sowie einmal mit Aqua deion., um die nichtgebundenen Antikörper auszuwaschen. Anschließend erfolgt in Dunkelheit das 30minütige Einwirken des Fluoreszenz AK (FITC- Fluoresceinisothiocyanat- Derivat des Fluoreszeins, leuchtet gelb- grün, Absorptionsspektrum 495nm, Emissionsspektrum 528nm), der 1:100 in

Albuminpuffer verdünnt wurde, sowie einer dreimaligen TBS- Waschung. Zuletzt erfolgt das Waschen in Aqua deion., die Trocknung auf der Heizplatte (60°C ca. 5 Minuten) und das Eindeckeln mit 25µl Antifade, zur Stabilisierung des Fluoreszenzfarbstoffes, mit einem 24x50mm Deckglas. Paraffinschnitte müssen erst demaskiert werden. Der Objektträger wird 10 Minuten mit TBS, 30 Minuten mit Hyaluronidase (0,0015g auf 15ml PBS) bei 37°C überschichtet und dann 3x mit PBS gewaschen. Danach erfolgt die Bindung des Primärantikörpers und des Fluoreszenz-antikörpers analog zu den Kryoschnitten. Die Negativkontrolle bei Immunfluoreszenz erfolgt durch Inkubation des Gewebes mit dem Fluoreszenz-Antikörper ohne vorherige Bindung des Primärantikörpers und dürfte nicht zu einer Fluoreszenz führen.

6.7.6. Auswertung der Histologien

Die histologischen Bilder sind in die klassische OCD- Gruppe und in die Trauma –Gruppe eingeteilt worden. Ausgewählte Präparate werden miteinander hinsichtlich ihrer Struktur, dem Gehalt an ECM, Zellen, Architektur und dem Vorhandensein von Kollagenen, mittels der Immunfluoreszenz, in den spezifischen Schichten, verglichen. Aufgrund der zusätzlichen immunhistologischen Daten wurde der Mankin Score (Mankin et al. 1971) erweitert und die histologischen Bilder im M- Score ausgewertet (Tab. 8). Die Eigenschaften von Struktur, Zellen, Zellverteilung, Chondronstruktur, Matrix, Mineralisation, Alkalischer Phosphatase, subchondralem Knochen (sofern vorhanden), Tidemarkintegrität (sofern vorhanden), Safranin- O- Anfärbbarkeit und immunhistochemisch: Kollagen Typ I, -II und –X wurden in den M- Score aufgenommen. Maximal können 29 Punkte im M- Score für chondrale Knorpelstückchen erreicht werden. Osteochondrale Knorpelstücke, die nur in sehr geringer Anzahl zur Auswertung gelangen, können maximal 32 Punkte erlangen. Je höher der Punktwert, desto stärker ist die Schädigung. Die Einteilung der Schweregrade (Abb. 19) im M- Score wird wie folgt ermittelt: 0-3 Punkte entsprechen normalem Knorpel, 4-10 Punkte einem mäßig geschädigten Knorpel, 11- 20 Punkte einem schwer geschädigten Knorpel und 21- 32 Punkte einem schwerst geschädigten Knorpel dessen knorpelspezifische Strukturen nicht mehr erkennbar sind. Dabei stellt die Notch, sowohl im OCD-, als auch im Trauma- Gelenk ein nicht lastentragendes Areal im interkondylären Bereich des Kniegelenkes dar. Das Dissekat ist ein freier Gelenkkörper im OCD- Knie. Das Korrelat des Dissekates im Trauma- Knie

entspricht dem Flake. Die hinterlassene lädierte Stelle, wird bei der Osteochondrosis dissecans als Mausbett und bei einem Trauma als Defekt bezeichnet. Als Defektrand wird der makroskopische Saum zum gesunden Gelenkknorpel gezählt, wobei die Festlegung relativ subjektiv erfolgt. Die gleiche Definition wird auch für die Auswertung der RT-PCR gewählt.

Struktur		Tidemarkintegrität	
normal	0	intakt	0
oberflächliche Irregularitäten	1	gestört	1
interne Irregularitäten	2	Alkalische Phosphatase (IHC)	
komplette Desorganisation	3	keine (nur im kalzifizierten Knorpel)	0
Zellen		mäßiger Nachweis	1
normal	0	sehr starker Nachweis	2
diffuse Hyperzellularität	1	Safranin- O- Färbung	
Klonierung	2	normal	0
Hypozellularität	3	geringe Reduktion	1
Zellverteilung		mäßige Reduktion	2
normal	0	schwere Reduktion	3
leichte Abweichungen	1	keine SO- Färbung	4
Cluster	2	Kollagen-Typ-I (IHC)	
Individuelle Zellen/ Desorganisation (keine Knorpelstruktur)	3	normal	0
Chondronstruktur		mäßiger fokaler Anstieg	1
normale Matrixsynthese	0	Nachweis im gesamten Präparat	2
fokale Reduktion der Synthese	1	Kollagen-Typ-II (IHC)	
generalisierte Reduktion der Synthese	2	normal	0
Reduktion und Neusynthese	3	mäßiger Verlust	1
keine Matrixsynthese	4	kein Kollagen- Typ- II Nachweis	2
Matrix		Kollagen-Typ-X (IHC)	
hyalin	0	normal	0
hyalin/ Faserknorpel	1	mäßiger fokaler Nachweis	1
Faserknorpel	2	Nachweis im gesamten Präparat	2
fibröses Gewebe	3		
Mineralisation			
normal	0		
abnormal/ unnatürliche Lokalisation	1		
Subchondraler Knochen (falls existent)			
normal	0		
aktiver Umbau	1		
Knochennekrose/ Granulationsgewebe durchbrochen/ Frakturkallus	2		

Tab. 8:
M- Score modifiziert nach
Mankin (Mankin et al. 1971)

6.8. Auswertung der Krankenakten

Das aus zwei Teilen, dem Patiententeil und dem chirurgischen Teil, bestehende Cartilage Injury Evaluation Package soll dazu beitragen die Ergebnisse zu standardisieren sichert die Qualität bei der Anwendung. In der Arbeit steht nicht die komplette Auswertung der Krankenakten und Fragebögen im Vordergrund , so dass nur einige wichtige Parameter verglichen werden wie z.B. Lokalisation, Stadium, weitere Defekte, frühere Schäden, Vorbehandlungen, Traumata, BMI sowie das Beschwerdebild vor der ACT und danach.

7. Ergebnisse

7.1. Auswertung der Patientendaten

Es wurden 31 Patienten (Tab. 3+4) mit einem Knorpelschaden der ICRS- Klassifikation III und IV untersucht, von denen 16 Patienten im Alter von 31 \pm 16 Jahren, einer Körpergröße von 175cm \pm 11cm und einem durchschnittlichen Gewicht von 79kg \pm 13,5kg ein Trauma erlitten haben, und 15 Patienten im Alter von 27 \pm 13 Jahren mit einer Körpergröße von 173cm \pm 16cm und einem durchschnittlichen Gewicht von 80kg \pm 27kg von einer OCD betroffen waren. Im Trauma- Kollektiv wurden 11 männliche und 5 weibliche Patienten, im OCD- Kollektiv 10 männliche und 5 weibliche Patienten untersucht. Der BMI liegt in beiden Gruppen mit 26 \pm 3 für die Trauma- und 26 \pm 7 für die OCD- Gruppe in etwa gleich. Unterschiede ergeben sich bezüglich der Defektgröße und der Lokalisation (Abb.7.1.A). Im Trauma sind kleinere Defekte (4,28cm² \pm 1,98cm²) als bei der OCD (6,41cm² \pm 4,99 cm²) zu entdecken. Dafür finden sich im traumatisch geschädigten Gelenk häufiger kombinierte Defekte wie z.B. linker lateraler FC (Femurcondylus) und retropatellar, linker lateraler und medialer FC und retropatellar sowie rechter medialer FC und retropatellar, die jeweils einmal gezählt werden konnten (Abb. 18). Bei der OCD wurde nur einmal ein kombinierter Defekt am linken medialen und lateralen FC beobachtet. Während die geschädigten Gelenkflächen bei der OCD relativ eindeutig in sechs Fällen den rechten medialen FC und in sechs Fällen den linken medialen FC betreffen (Abb. 18), ausgenommen die einmalige Lokalisation am linken lateralen FC und einmalig links retropatellar, zeigt sich in der Trauma- Gruppe eine größere Heterogenität. Denn dort wurde viermal der rechte mediale FC, dreimal links retropatellar, zweimal der linke mediale FC und jeweils einmal rechts retropatellar, der rechte laterale FC, der linke laterale FC und einmal der linke mediale Talus gezählt. Auffällig ist auch die relativ häufige retropatellare Lokalisation im Trauma. In einem Fall konnte ein beidseitiger Befall des Kniegelenkes durch die OCD nachgewiesen werden. Das durchschnittliche Beschwerdebild besteht für die OCD deutlich länger und beträgt 4 Jahre \pm 4 und für das Trauma 1 Jahr \pm 1,4. Zusätzliche Gelenkbinnenschäden sind im Trauma zahlreicher, als bei der OCD. Es sind sieben, isolierte Knorpelschäden im Trauma und elf im OCD- Gelenk zu verzeichnen. Während im OCD- Gelenk der Knorpelschaden in drei Fällen mit einer Bandinstabilität, in einem Fall mit einem Meniskusschaden und einmal eine Kombination von Bandinstabilität und Meniskusschaden einhergeht, zeigen sich im

Trauma- Gelenk vier kombinierte Bänder- und Meniskusschäden, zwei isolierte Meniskusschäden und eine Bandinstabilität sowie zwei Patellafehlfunktionen.

Die Anzahl der Vor- Operationen sind in beiden Gruppen ungefähr gleich (Trauma 0,8 Operationen +/-0,9 und OCD 1,2 Operationen +/- 1,1).

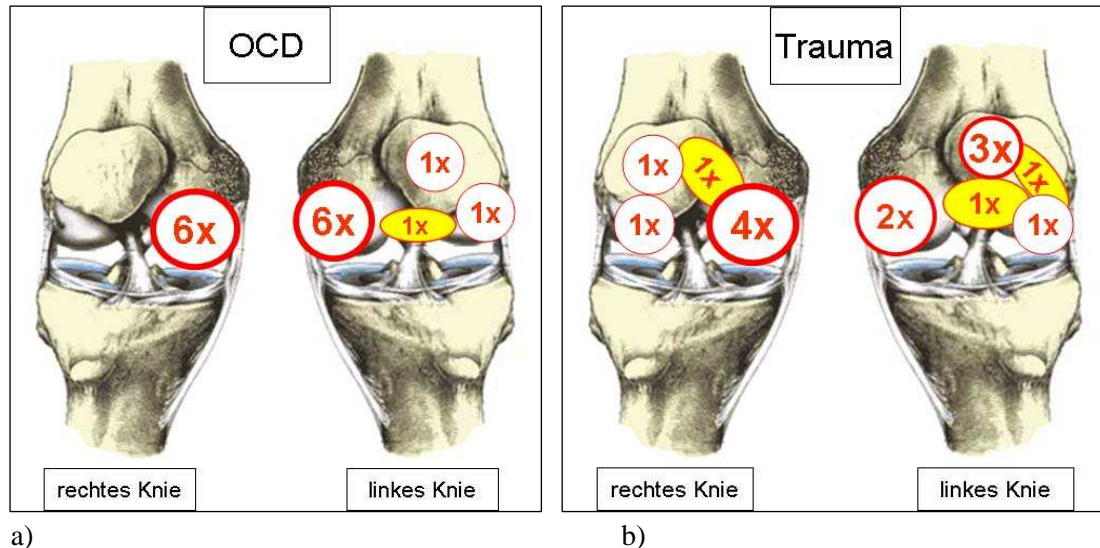


Abb. 18: schematische Darstellung der Defektlokalisationen bei a) OCD und b) Trauma

7.2. Auswertung der Histologie und Immunhistochemie

In einer Erweiterung der Mankin- Skala wurden die histologischen Bilder im M- Score (Tab. 8) ausgewertet und sollen hier beschrieben werden. Die Eigenschaften von Struktur, Zellen, Zellverteilung, Chondronstruktur, Matrix, Mineralisation, Alkalischer Phosphatase, subchondralem Knochen (sofern vorhanden), Tidemarkintegrität (sofern vorhanden), Safranin- O- Anfärbbarkeit und immunhistochemisch: Kollagen Typ I, II und X (nicht Teil der originalen Mankin- Skala) wurden in den M- Score aufgenommen. Maximal können 29 Punkte im M- Score für chondrale Knorpelstückchen erreicht werden. Osteochondrale Knorpelstücke, die nur in sehr geringer Anzahl zur Auswertung gelangen, können maximal 32 Punkte erlangen. Je höher der Punktwert, desto stärker ist die Schädigung. Die Einteilung der Schweregrade im M- Score wird wie folgt ermittelt: 0- 3 Punkte entsprechen normalem Knorpel, 4- 10 Punkte einem mäßig geschädigten Knorpel, 11- 20 Punkte einem schwer geschädigten Knorpel und 21- 32 Punkte einem schwerst geschädigten Knorpel, dessen knorpelspezifische Strukturen nicht mehr erkennbar sind. Es wurden insgesamt 40 Proben ausgewertet (Abb. 19). Für die Histologien der OCD stammen elf aus dem Dissekatgewebe, zwei aus der Notch und vier aus dem Mausbett. Vom traumatisch geschädigten Knie stammen sieben Präparate aus dem Flake, zwölf aus

dem Defekt und vier aus dem Defektrand. Dabei stellt die Notch sowohl im OCD- als auch im Trauma- Gelenk ein nicht lastentragendes Areal im interkondylären Bereich des Kniegelenkes dar. Das Dissekat ist ein freier Gelenkkörper im OCD- Knie. Das Korrelat des Dissekates im Trauma- Knie entspricht dem Flake. Die hinterlassene lädierte Stelle wird bei der Osteochondrosis dissecans als Mausbett und bei einem Trauma als Defekt bezeichnet. Als Defektrand wird der makroskopische Saum zum gesunden Gelenkknorpel gezählt, wobei die Festlegung relativ subjektiv erfolgt. Die gleiche Definition wird auch für die Auswertung der RT- PCR gewählt.

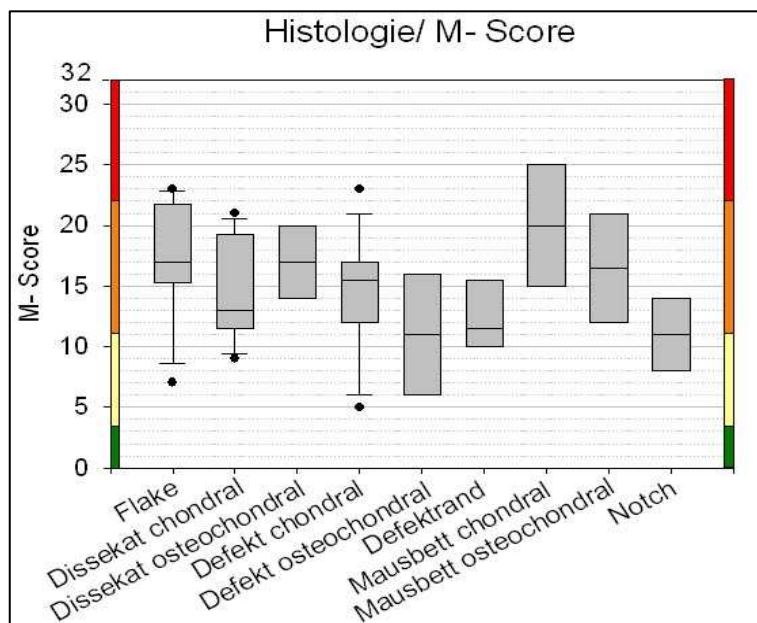


Abb. 19:
Darstellung der histologischen Auswertung mittels M-Score von Flake, Dissekat (chondral und osteochondral), Defekt (chondral und osteochondral), Defektrand, Mausbett (chondral und osteochondral) und Notch

Die besten Knorpel Eigenschaften besitzt mit einem geringeren M- Score bzw. einem mäßig bis schwer geschädigten Knorpel das Notchgewebe ($11 \pm 4,2$). Danach schließen sich die Präparate der osteochondralen Defekte ($11 \pm 7,1$), des Defektrandes ($12,75 \pm 3,8$) und die Präparate des Dissekates ($13,6 \pm 3,9$) an. Mit schweren, degenerativen Knorpelveränderungen folgen die Präparate der chondralen Defekte ($14,4 \pm 5,4$) und der chondralen ($14,5 \pm 4,4$) bzw. osteochondralen Dissekate ($17 \pm 4,24$). Die Knorpelflakes ($17,3 \pm 5,5$) sind neben den Präparaten des Mausbettes (20 ± 7) und osteochondralen Präparaten des Mausbettes ($16,5 \pm 6,4$) äußerst stark degenerativ verändert. Teilweise ist keine Struktur von hyalinem Knorpel existent.

Sowohl im Defekt als auch im Dissekat und weniger im Flake sind Knorpelpräparate vorhanden, die gesundem Knorpelgewebe histologisch ähnlich sind, aber dennoch oberflächliche oder sogar tiefer reichende, strukturelle Irregularitäten aufweisen. Die

Präparate von Defekt, Defektrand und Mausbett sind in ihrer Qualität abhängig von der Entnahmestelle in situ. Es hat sich gezeigt, dass mehrere Proben innerhalb eines Areals große Unterschiede ihres M- Scores aufweisen (Abb. 34). Der M- Score dieser Lokalisationen ist nicht standardisiert wie beispielsweise der von Dissekat und Flake. Selbst in den Präparaten der Notch sind mäßige bis schwere degenerative Veränderungen zu erkennen. Ein Präparat zeigt eine fehlende Tidemarkintegrität (Abb. 35). Allerdings ist die Aussagekraft über die Qualität der Notch- Histologien aufgrund ihrer geringen Anzahl begrenzt. Starke, degenerative Veränderungen finden sich vor allem bei den Knorpelflakes und im Mausbett, die vorwiegend fibrös umgewandelt sind. Hinzuzufügen ist die Tatsache, dass alle Knorpelstückchen zur Auswertung verwendet wurden, die aus dem Operationssaal eingegangen sind und bei denen eine OCD bzw. ein Trauma gesichert war. Vielmehr soll im Folgenden die Bandbreite der Individualität aufgezeigt werden und im Vergleich zur RT- PCR (Kapitel 7.4.) die Fähigkeit der Kultivierbarkeit sowie der Regeneration unter Zellkulturbedingungen.

7.2.1. Darstellung ausgewählter Histologien von Dissekat und Flake

Die folgenden, histologischen Präparate dienen der Veranschaulichung der enormen Bandbreite des untersuchten Materials, der großen Heterogenität aller Kollektive sowie dem Vergleich untereinander. Des Weiteren finden sich Gemeinsamkeiten hinsichtlich der Progression lokaler Schädigungen in die Arthrose. Aus den insgesamt 40 Präparaten kann nur eine kleine Auswahl präsentiert werden, die die Gemeinsamkeiten und Spezifitäten der histologischen Untersuchungen darstellen sollen.

7.2.1.1. Gegenüberstellung von Dissekat EM84 und Dissekat HS75

Die histologischen Präparate von EM84- Dissekat (M- Score: 9) und HS75 (M- Score: 19) zeigen durch die Darstellung eines qualitativ moderaten Knorpelgewebes bei EM84 und eines Knorpelstückes von sehr schlechter Qualität bei HS75 die Bandbreite der Dissekate (Abb. 20+21). Während bei EM84 nur ein oberflächlicher Verlust von Proteoglykanen zu verzeichnen ist, kann im Präparat HS75 ein genereller Verlust angegeben werden. Die Knorpelzellen erscheinen bei HS75 in allen Schichten und bei EM84 nur in der tangentialen Schicht vermindert. Allerdings finden sich bei letzteren in den tiefen Knorpelschichten hypertrophe Zellen. Obwohl bei HS7 kaum eine knorpeltypische Struktur

vorliegt, ist der Nachweis für Kollagen Typ I negativ. Kollagen Typ X kann vereinzelt im gesamten Präparat und Alkalische Phosphatase im Bereich des kalzifizierten Knorpels dargestellt werden.

Bei EM84 können immunhistochemisch kein Kollagen Typ I, II und X, sowie Alkalische Phosphatase nachgewiesen werden.

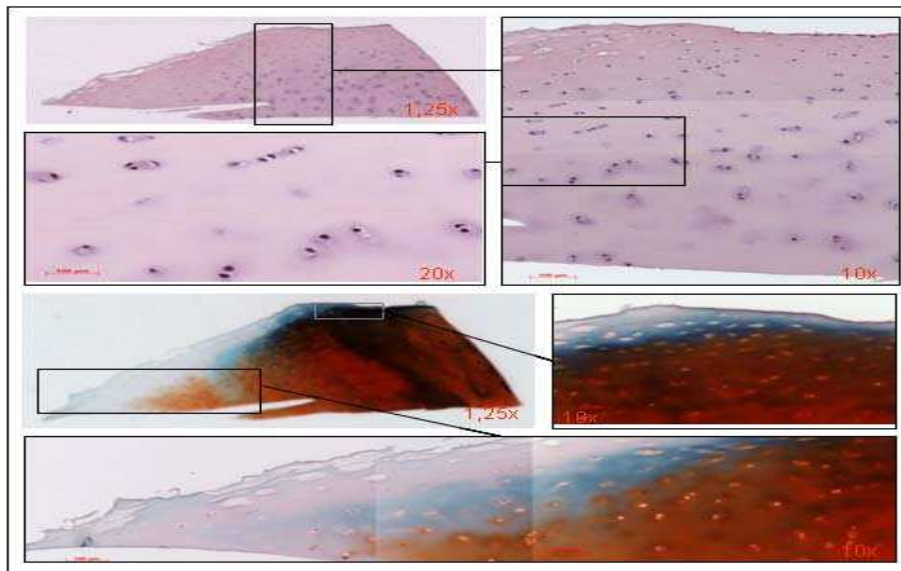


Abb. 20:
EM84 Dissekat
M- Score: 9

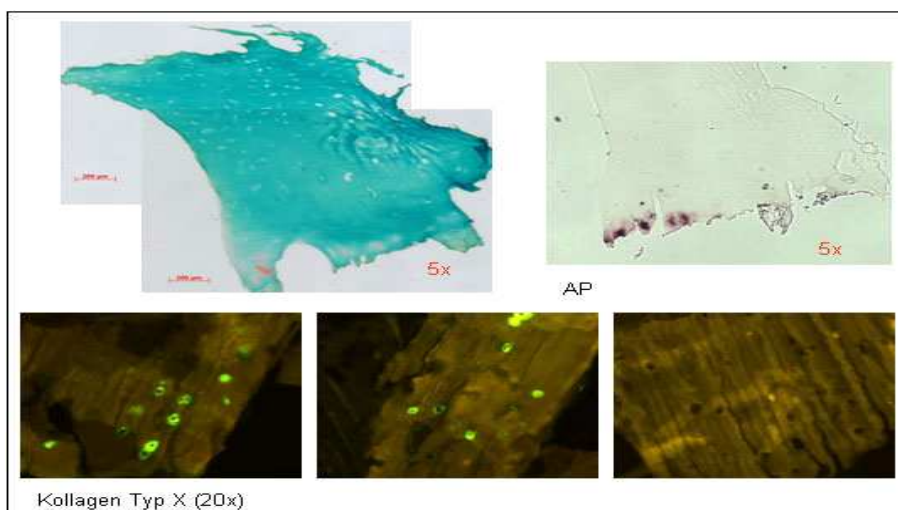


Abb. 21:
HS75 Dissekat
M- Score: 19

7.2.1.2. Gegenüberstellung von Flake HS73 und Flake PH60

Im Folgenden werden das Flake HS73 (Abb. 22) mit relativ guter Qualität und einem M-Score von 6 sowie das Flake PH60 (Abb. 23) von sehr schlechter Qualität mit einem M-Score von 23 gezeigt, damit die Bandbreite der histologischen Variationsbreite der Flakes vorgestellt werden kann.

Das Präparat HS73 präsentiert sich in seiner kompletten Struktur ohne den subchondralen Knochen mit einer diffusen Hyperzellularität und mit oberflächlichen, fibrösen

Einlagerungen, demaskierten, kollagenen Fasern sowie oberflächlichen Fissuren. Der immunhistochemische Nachweis und der von Alkalischer Phosphatase gelingt nicht. Das Flake PH60 weist demgegenüber keine knorpeltypische Struktur auf. Es ist fibrös umgewandelt, komplett frei von Proteoglykanen und scheinbar besiedelt von Fibroblasten. Nur an einer Stelle kann eine Detektion von Kollagen Typ X erfolgen. Die übrige Immunhistochemie und der Nachweis von Alkalischer Phosphatase sind negativ. Auffällig ist, dass viele Flakes teilweise komplett fibrös umgewandelt sind.

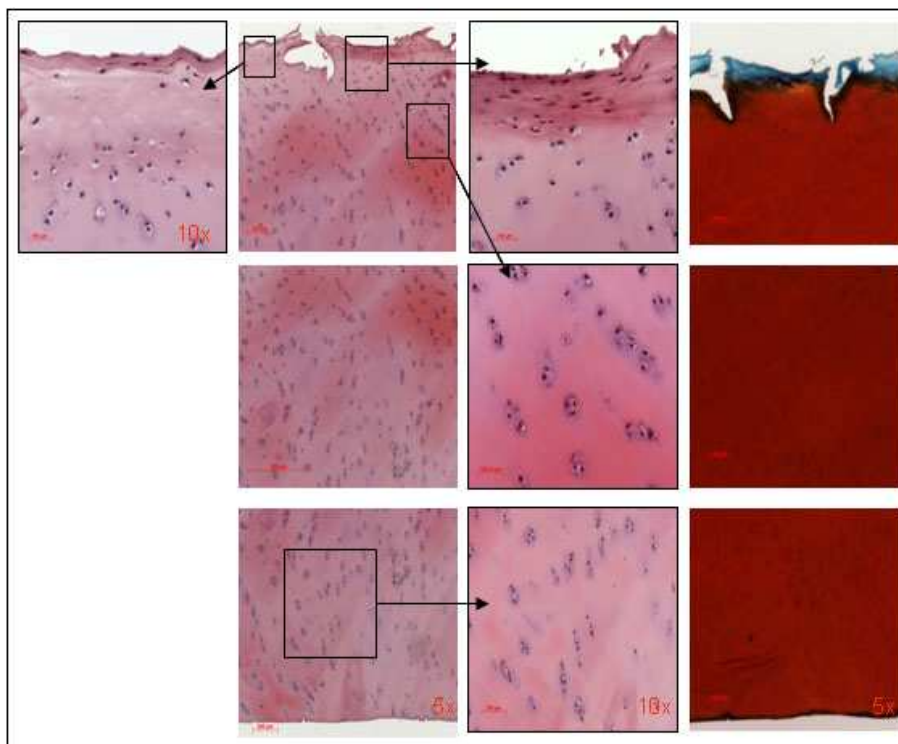


Abb. 22:
HS73 Flake
M- Score: 6

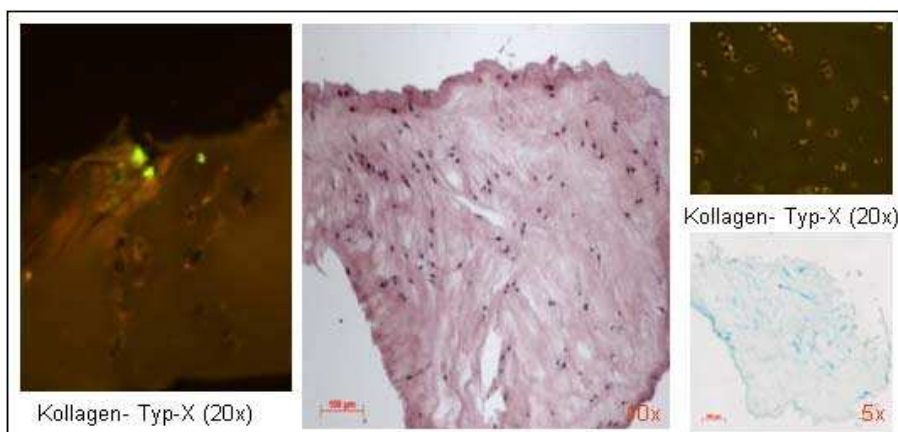


Abb. 23:
PH60 Flake
M- Score: 23

7.2.1.3. Gegenüberstellung von Dissekat HS81 und Dissekat BP87

Die beiden Präparate der Dissekate HS81 und BP87 sind ungefähr gleich stark geschädigt. Obwohl das Bild der Histologie von BP87 im HE und SO- Bild relativ homogen erscheint, werden durch die Kollagen Typ X- Detektion und den Nachweis von massenhaft Alkalischer Phosphatase deutliche Hypertrophiezeichen dargestellt. Im Präparat HS81 zeigen sich dagegen in den tiefen Knorpelschichten hypertrophe Cluster ohne den Nachweis von Kollagen Typ X und Alkalischer Phosphatase.

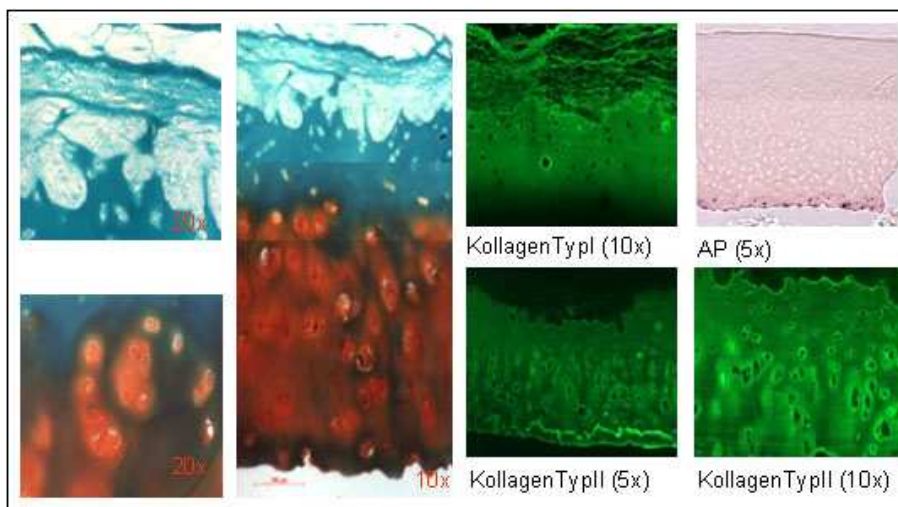


Abb. 24:
HS81 Dissekat
M- Score: 12

Das Dissekat HS81 (Abb. 24) mit einem durchschnittlichen M- Score von 12 zeigt in der oberflächlichen Schicht und einem Teil der mittleren Schicht fibröse Einlagerungen, den Verlust knorpeltypischer Strukturen und leere Chondrone. Auch bei BP87 (Abb. 25) mit einem M- Score von 10 zeigt sich in der superfiziellen Schicht eine fibröse Umwandlung mit einem Verlust an Proteoglykanen und Chondrozyten, die aber nicht die Dimensionen des Präparates HS81 erreichen. Ausnahme davon bildet ein, an der Oberfläche gelegenes Areal mit Matrixneusynthese. Kollagen Typ I ist in beiden Präparaten in den oberflächlichen Schichten nachzuweisen. An der Oberfläche von BP87 liegen leere Chondrone mit einer interterritorialen Anreicherung von Kollagen Typ I. Etwas tiefer liegend können Knorpelhöfe mit Kollagen Typ I fluoreszierend dargestellt werden. Während Kollagen Typ II bei BP87 im gesamten Präparat detektiert wird, tritt es bei HS81 nur in den tiefen Schichten gebildet von hypertrophen Clustern auf. Beide Präparate sind in der radiären und tiefen Schicht relativ reich an Proteoglykanen, die von vielen und diffus, d.h. ohne knorpelspezifische Ausrichtung, gelegenen Chondrozyten gebildet werden.

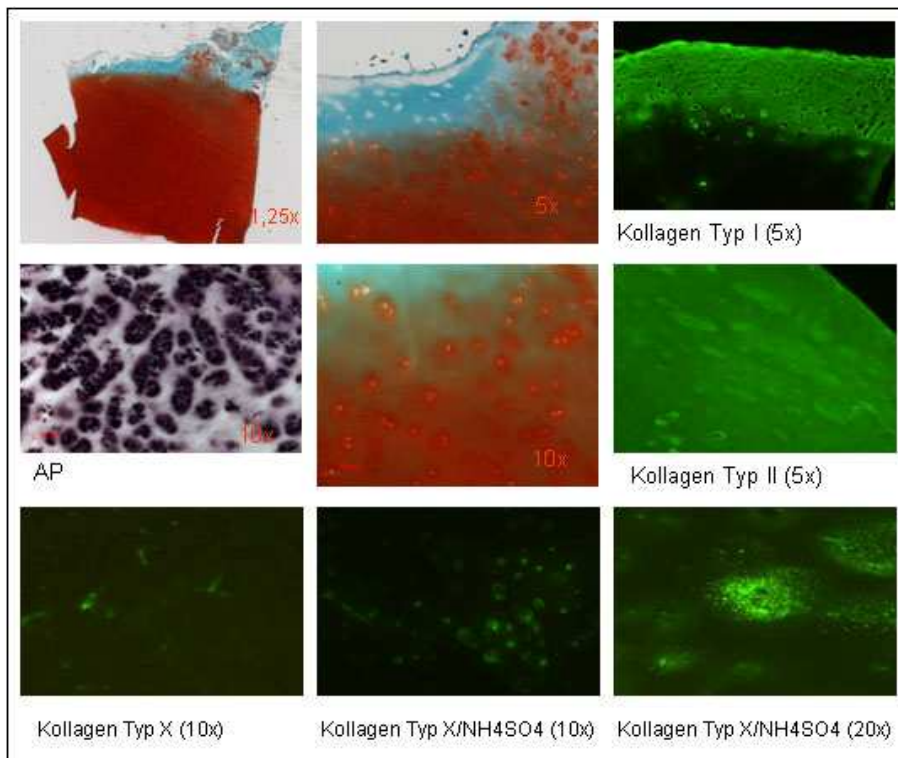


Abb. 25:
BP87 Dissekat
M-Score: 10

7.2.1.4. Darstellung des Dissekates RJ57

Bisher sind nur chondrale Knorpelstücke dargestellt worden. Aufgrund der vermuteten Ätiologie der OCD und dem unmittelbaren Zusammenwirken von Knorpel und subchondralem Knochen soll hier ein Beispiel über die histologischen Veränderungen gegeben werden.

Das histologische Präparat von RJ57 (Abb. 26) ist ein typisches wie im Lehrbuch beschriebenes Dissekat mit knorpeligen und knöchernen Anteilen (Rehbein 1950, Puhl 1974) Das Präparat ist in der Hämatoxylin- Eosin, Safranin- O und Masson- Goldner-Färbung dargestellt. Bei der Betrachtung der Übersicht in der SO- Färbung kann im Gesamten von einem enormen Verlust an Proteoglykanen ausgegangen werden. Knorpelspezifische, extrazelluläre Matrix ist im Bereich der tiefen Knorpelschichten und der Tidemark im linken und mittleren Abschnitt des Präparates vorhanden. In der oberflächlichen und mittleren Zone sind nur minimale Mengen deponiert. Das Dissekat ist aufgrund der Matrixverteilung in drei Zonen zu unterteilen. Auf der linken Seite der SO-Übersicht befindet sich ein Areal mit Bildung von extrazellulärer Matrix in der mittleren und tiefen Schicht. Die Tidemark scheint relativ homogen und intakt. Im darüber liegenden Knorpel befinden sich geringfügig vergrößerte Chondrozyten, die in knorpeltypischer Struktur vorliegen. Etwa ab dem linken Drittel des Präparates ist ein Abfall der

Proteoglykanmenge zu erkennen, bis bei ca. der Hälfte des Präparates eine deutliche Verringerung der Proteoglykane um ca. 60% in der tiefen Schicht nachweisbar ist. Dafür zeigen sich große, hypertrophe und deutlich rot gefärbte Knorpelzellen unmittelbar an der Tidemark. Die Knorpelzellen in der darüber liegenden, tiefen Schicht sind nicht so stark hypertrophiert wie in dem links daneben liegenden Areal mit stärkerem Proteoglykangehalt. Die sehr eindrucksvollen, hypertrophen Chondrozyten der mittleren Knorpelschicht nehmen waabige Formationen an. Sie haben die Produktion von Proteoglykan erneut aufgenommen, was an der deutlichen Rotfärbung der Knorpelhöfe inmitten der proteoglykanärmeren Matrix zu erkennen ist. Auch in der superfiziellen und oberen, mittleren Schicht können im mittleren Bereich derartige Zellen aufgefunden werden. Dort allerdings ohne Proteoglykansynthese.

Auf der rechten Bildseite, ca. das rechte Drittel betreffend, offenbart sich eine Läsion zwischen Knochen und Knorpel mit einwachsenden Bindegewebszügen. Die Tidemark ist schlechter abgrenzbar. Darüber liegende Chondrozyten sind spärlicher und nicht so stark hypertrophiert. Eventuell besteht ein Zusammenhang zur Zellkonformation der tiefen Schichten bei scheinbar intakter Tidemark.

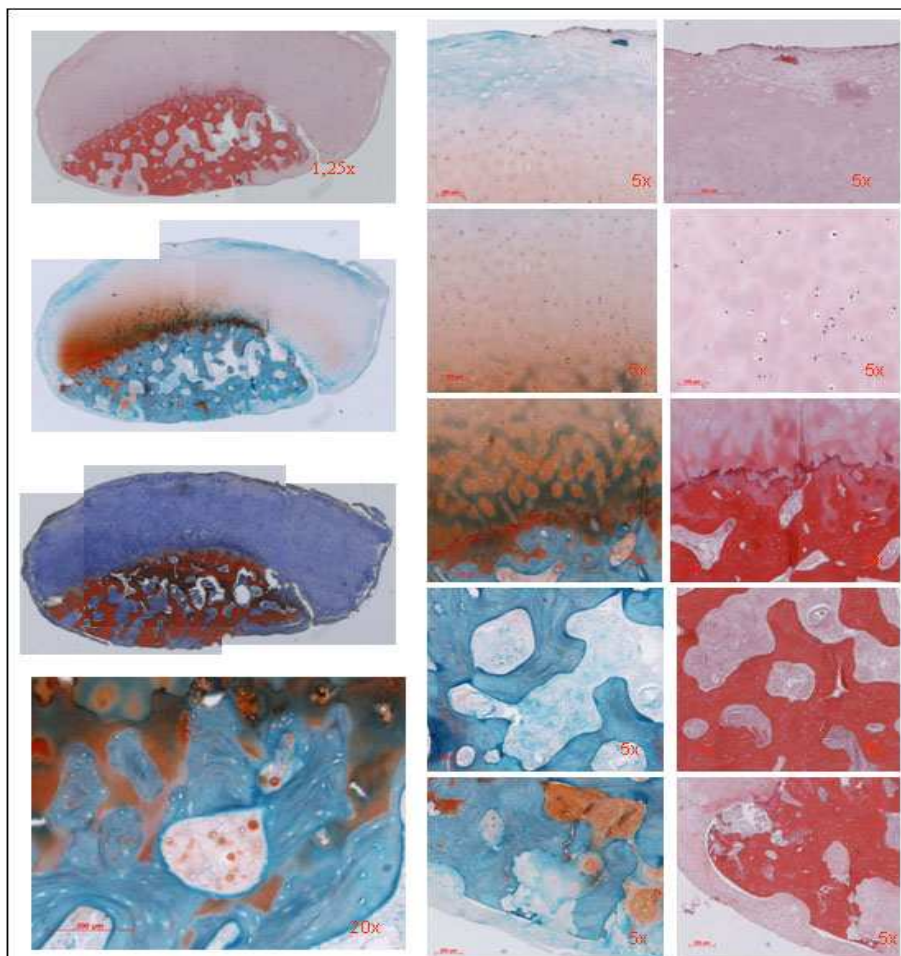


Abb. 26 :
RJ57 Dissekat
M- Score: 14

Der linke und rechte Präparatrand imponiert mit proteoglykanarmer Matrix umgeben von einem fibrösen Randsaum und leeren, vormals vergrößerten Chondronen. Der Knochen zeigt eine Verplumpung der Spongiosa und eine geringe Anzahl von Osteozyten. In den Knochenmarksräumen befindet sich Bindegewebe und häufig Anschnitte von Gefäßen. Das Bindegewebe differiert in seinem Aussehen. Es wechseln sich faserreiches, zellreiches oder matrixbildendes Fasergewebe ab. In manchen Markräumen gelingt der Nachweis von Proteoglykanen, die vorzugsweise von großen, runden, hypertroph erscheinenden Zellen gebildet werden. Manchmal wird der Eindruck erweckt, dass sich knorpelige Strukturen, d.h. isogene Gruppen, aus Vorläuferzellen des Knochenmarkes oder durch Umdifferenzierung entwickeln. Es können sich innerhalb des Bindegewebes Zellgruppen ausbilden, die gemeinsam extrazelluläre Matrix bilden. Im Bereich der Knorpelknochen-grenze sind die Osteoidstrukturen verwaschen, und es finden sich, diffus verstreut chondroide Zellen, die scheinbar in Beziehung zu den Clustern der Tidemark stehen (Abb. 26, SO 20x).

7.2.1.5. Darstellung des Dissekates ML57

Die histologische Darstellung des Dissekates ML57 (Abb. 27) zeigt eine typische Formierung von Knorpelzellen wie sie in der Wachstumsfuge vorgefunden wird. Besonders in der tangentialen und radiären Schicht zeigt sich dieses Phänomen von massenhaft angesiedelten Zellen, die in diesem Areal stark positiv für die Alkalische Phosphatase und negativ für die immunhistochemische Kollagen Typ X- Detektion sind. Abgeschlossen wird die Zone der Überproduktion von Proteoglykanen von zellfreiem, mehrlagigem Bindegewebe. Das gesamte Präparat ist positiv für Kollagen Typ I und Alkalischen Phosphatase. Tiefere Schichten sind geprägt von hypertrophen Clustern inmitten einer proteoglykanarmen Matrix, die durch einen zellreichen und proteoglykanreichen Zapfen, der Anschluß an den subchondralen Knochen erhält, durchbrochen wird und somit von mesenchymalen Vorläuferzellen gespeist wird. Diese Erscheinung könnte Ursache einer tief reichenden Spaltbildung sein, die eventuell sogar durch eine Friedie- Bohrung ausgelöst wurde. Zu beachten sind auch einige Blutgefäße in der oberen Schicht, innerhalb vom Übergang des zellreichen Gefüges in das Stroma der oberflächlichen Schichten. Das Phänomen der Wachstumsfuge wird aber nicht nur im Dissekat nachgewiesen, sondern auch im Defekt BF85-1 (Abb. 33). Dort zeigt sich ebenfalls zwischen tangentialer und radiärer Schicht eine Einlagerung von säulenartig gelagerten Zellen, ohne direkten Anschluss an subchondrale Gebiete.

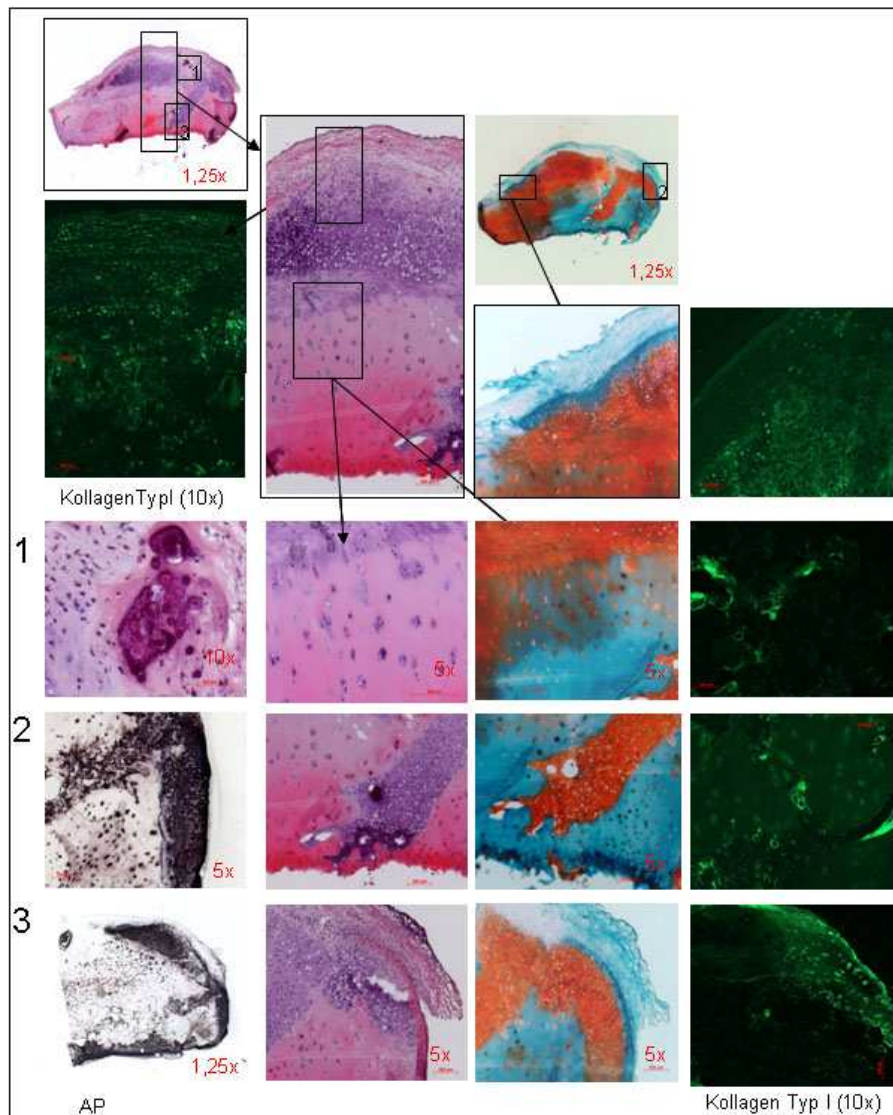


Abb. 27:
ML57 Dissekat
M- Score: 21

7.2.2. Darstellung ausgewählter Histologien von Defekt, Defektrand, Mausbett und von der Notch

7.2.2.1. Gegenüberstellung von Mausbett KU47 und Defektrand DM73

Im Folgenden werden die Defekte, Defektränder und Mausbetten als Residuen der Ablösungszone von Knorpelstückchen dargestellt. In Abhängigkeit von Zeit, einwirkenden Belastungen und der Einbindung in ein Zellkollektiv sowie den jeweiligen, beeinflussenden Reparaturmechanismen können unterschiedliche Beobachtungen gemacht werden. Jedoch zeigen sich in unterschiedlicher Stärke in allen Präparaten ähnliche Morphologien wie bei der Osteoarthritis. Mausbett und Defektrand stellen die unmittelbare Ablösungszone von Dissekat bzw. Flake dar. Ihnen gilt im folgenden Punkt die histologische Darstellung.

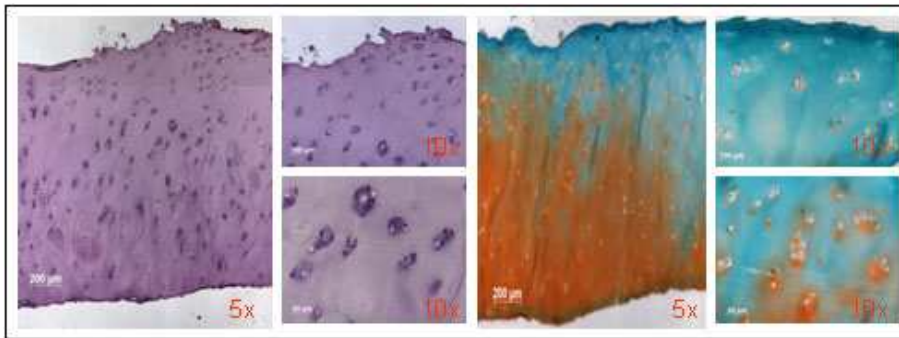


Abb. 28:
DM73 Defektrand
M- Score: 10

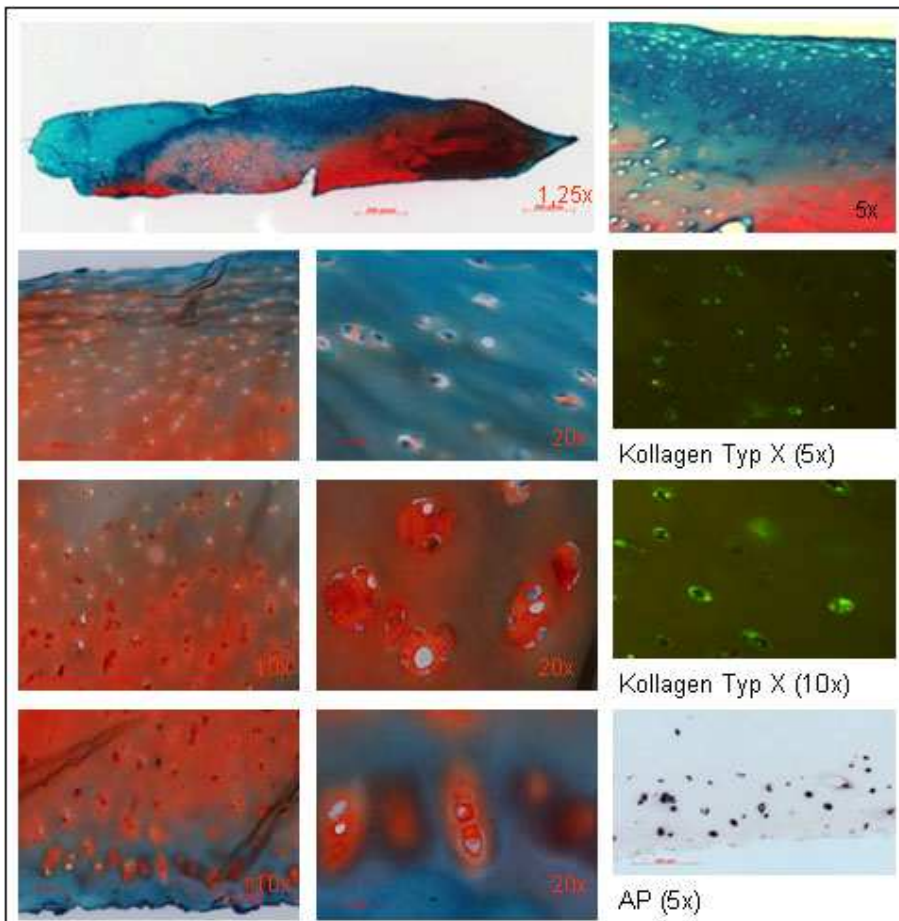


Abb. 29:
KU47 Mausebett
M- Score: 15

Es werden zwei chondrale Knorpelstückchen, KU47 Mausebett (Abb. 29) und DM73 Defektrand (Abb. 28) miteinander verglichen, die einen relativ starken Verlust von Proteoglykanen aufweisen. Der Rückgang der Proteoglykane geht homogen von der superfiziellen Schicht aus und schreitet in Richtung Tidemark fort. Es stellen sich allerdings in beiden Präparaten Areale mit einem stärkeren Proteoglykanverhalten und einer besseren Knorpelqualität dar, die wahrscheinlich die Verbindung zum umgebenden Knorpel herstellen. Die sich im Mausebett und Defektrand (Abb. 28+29) befindlichen tidemarknahen Inseln proteoglykanarmer Matrix werden von clusterartigen Chondrozyten

der tiefen Knorpelschicht besiedelt. Hier ist eine Neusynthese von Proteoglykan zu verzeichnen. Unterschiedlich kann die Ausbreitung der Cluster beobachtet werden, denn im Mausbett liegt ein zellfreier und proteoglykanarmer Saum unmittelbar über der Ablösungszone. Im Defektrand gibt es diesbezüglich keinen Kontinuitätsverlust. Auffällig ist im Mausbett auch die sich in den tiefen Schichten ausbreitende AP-Aktivität (Abb. 29, AP+ Kollagen Typ X). Kollagen Typ X ist bis in die mittleren Knorpelschichten detektierbar. Dagegen können diese im Defektrand nicht nachgewiesen werden. Defektrand und Mausbett unterscheiden sich ebenfalls in den oberflächlichen Knorpelstrukturen. Während im Mausbett eine vermehrte Zellanzahl mit Clusterbildungen und eine knorpel-typische Architektur mit erhaltener oberflächlicher Zellstruktur vermerkt werden können, dominieren besonders in der mittleren und oberen Schicht des Defektrandes diffus und irregulär verteilte, hypertrophe und clusterartige Chondrozyten mit deutlich stärkeren, degenerativen Schädigungen wie demaskierte Kollagenfasern, dem Fehlen tangentialer Faserzüge sowie dem Auftreten von oberflächlichen Erosionen.

7.2.2.2. Gegenüberstellung der Knorpelknochenstücke des Defektes BF85-1 und des Mausbettes EM84

In diesem Kapitel werden zwei Knorpelknochenstücke mit mehrseitigem Knorpelüberzug verglichen, die deutliche Zeichen der degenerativen Knorpeldestruktion aufweisen. Das Präparat BF85-1 stammt aus einem Defektgebiet, das Präparat EM84 aus einem Mausbett. Besonders im Präparat EM84 sind alle Stadien der Osteoarthritis vertreten. Mehrere Knochenglatzen (Abb. 30-32) mit verplumpter Spongiosa bilden die Oberfläche. Die erhaltenen Knorpelreste zeigen durch Asbestfaserung (Abb. 32), tiefe Fissuren (Abb. 30), Knorpelauflagerungen (Abb. 30), Blutgefäße (Abb. 30) sowie interne, strukturelle Atypien und starke Abweichungen vom Normalen (Abb. 30+32). Sogenannte Geröllzysten sind in Abb. 32 besonders gut erkennbar. Im Defekt BF85-1 (Abb. 33) imponieren oberflächliche Einlagerungen. Unter einer verdickten, von leeren Chondronen und Fibroblasten durchsetzten, superfiziellen Schicht befinden sich einerseits hypertrophe Knorpelzellohlen bedeckt von lockerem Bindegewebe und eingebettet in eine Matrix ohne Proteoglykane und andererseits unmittelbar nebeneinander, stark vermehrte, hypertrophe, in Palisaden angeordnete, proteoglykanbildende Chondrozyten (Abb. 33, SO 20x). Dabei erinnert die Form der Chondrozyten an embryonalen, hyalinen Knorpel der Wachstumsfuge.

Darunterliegende proteoglykanbildende Knorpelzellen in dennoch matrixarmen Umgebung scheinen durch isolierte Brutkapseln in Beziehung mit den Markräumen der Spongiosa zu stehen. Das Phänomen der Ausbildung eines morphologisch ähnlichen Korrelats einer Wachstumsfuge wird auch im Dissekat ML57 (Abb. 27) nachgewiesen. Allerdings zeigen sich die Areale im Präparat ML57 mit einer Mehranreicherung von Alkalischer Phosphatase, was bei BF85-1 nicht detektiert werden kann. Die Oberflächenintegrität des Präparates BF85-1 (Abb.33) ist nur in den Randzonen zerstört. Dort sind zumeist abschnittsweise vermehrt hypertrophe, proteoglykanhaltige Zellen scheinbar als Versuch einer appositionellen Regeneration verteilt. In beiden Präparaten fehlt der Nachweis von Proteoglykansynthese (Abb. 30-33). Die Vergrößerung der Spongiosa mit Knochennekrose, die verwaschene und durchbrochene Grenze zwischen Knochen und Knorpel sowie eine atypische Mineralisation als Keimzentrum, sind in Ansätzen auch in der Histologie des Mausbettes EM84 zu beobachten. Die Knochenmarksräume des BF85-1 Defektes (Abb. 33) sind größtenteils mit unterschiedlich dichtem Bindegewebe gefüllt, extrem vielen Matrix bildenden Wachstumsfugen ähnlichen Chondrozyten angereichert und zeigen sogar Blut gefüllte Räume. Zahlreiche Knochen-bälkchen sind verformt, zusammengewälzt, durch Bindegewebe arrodiert und strukturlos. Außerdem stellt sich eine Vermehrung der mineralisierten Matrix mit Hilfe von Neubildung dar. Dieses bunte Bild impliziert die Knochenneubildung durch enchondrale Ossifikation, entweder im Rahmen einer Frakturheilung oder der Ausprägung von Osteophyten als degeneratives Korrelat. Immunhistochemisch sind im Defekt (Abb. 33) keine Kollagene nachweisbar, ebenso wenig wie trotz histologisch mineralisierender Prozesse Alkalische Phosphatase detektiert werden kann. Die Spongiosaräume des Mausbettes enthalten schlecht abgrenzbare Knochenbälkchen mit nur vereinzelten Knochenzellen und sind (Abb. 30-32) mit zellarmem, lockerem Bindegewebe und mesenchymalen Zellen gefüllt. Dies erinnert an eine Knochennekrose. Scheinbar zapfenartig erfolgt der Versuch der Rekultivierung (Abb. 32) proteoglykanbildender, hypertropher Zellen, ausgehend von der bindegewebig veränderten Spongiosa und der kalzifizierten Matrix sowie durch die basalen Anteile des Knorpels hindurch (Abb. 32+32). Immunhistochemisch (Abb. 30+31) wird im mineralisierten Knorpel, an den Knorpel-auflagerungen und subchondral Kollagen Typ I detektiert. Die Interzellulärsubstanz des Knorpels zeigt Kollagen Typ II- Fluoreszenz, die sich in den oberflächlichen Knorpelschichten verringert.

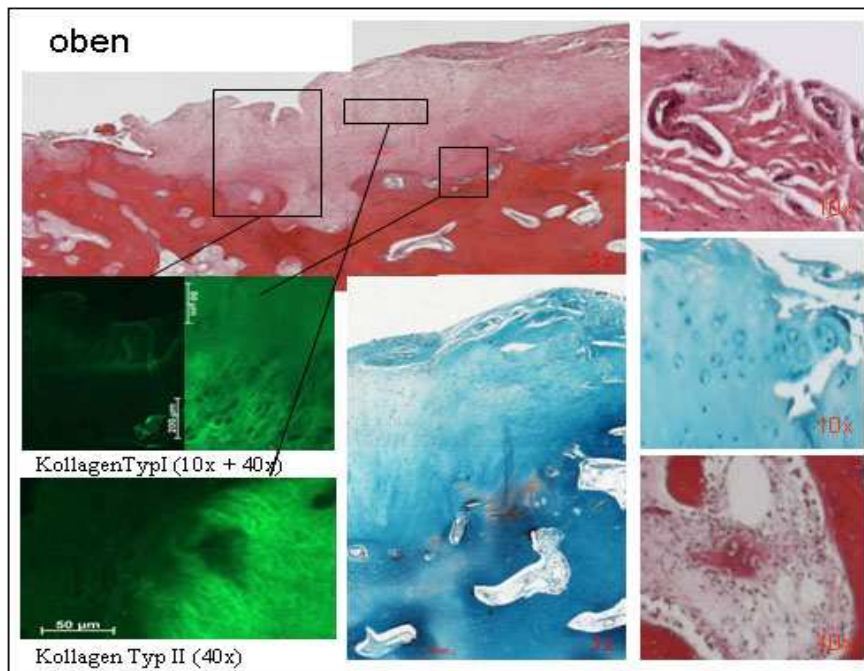


Abb. 30:
EM 84 Mausbett oben
M- Score: 21

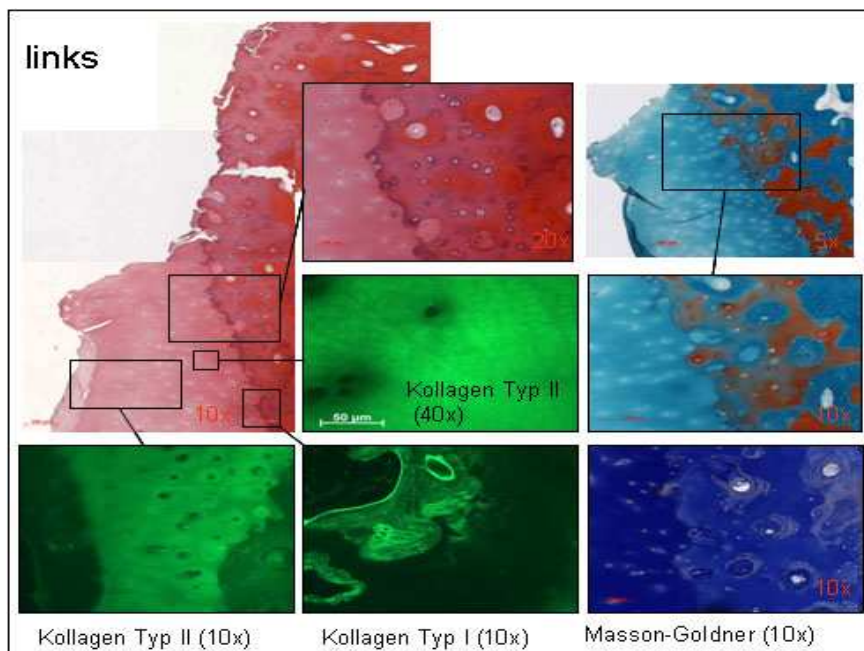


Abb. 31:
EM 84 Mausbett links

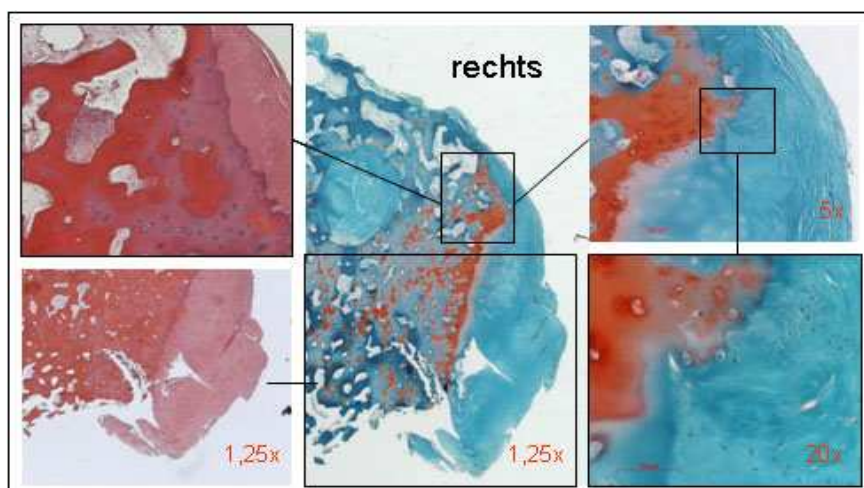


Abb. 32 :
EM 84 Mausbett rechts

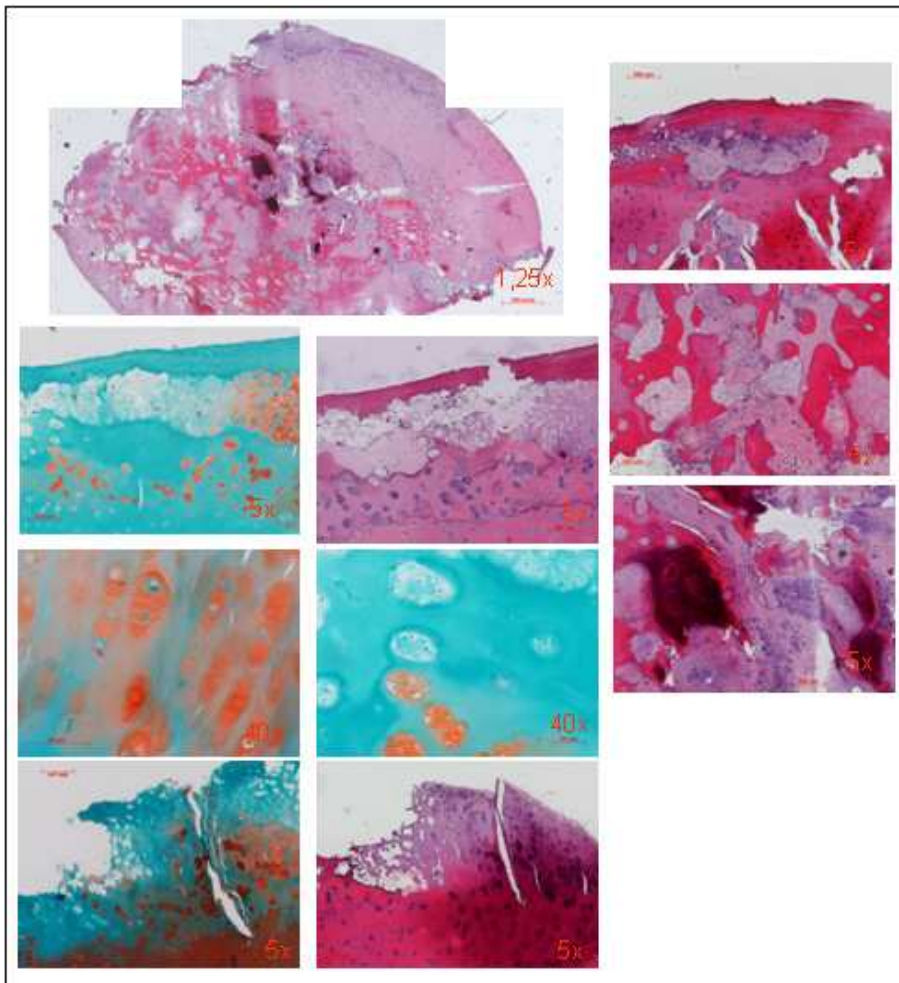


Abb. 33:
BF85- 1 Defekt
M- Score: 16

7.2.2.3. Darstellung des Defektes BJ79

Die nächsten vier histologischen Präparate (Abb. 34) stammen aus dem Defekt eines Patienten. Abhängig von der Entnahme in situ und dem entsprechenden Lokalbefund mit individuellen Reparaturmöglichkeiten ergeben sich unterschiedliche, histologische Ergebnisse. Während im Defekt I eine knorpeltypische Struktur mit oberflächlichem Integritätsverlust sowie fibrösen und zellreichen Einlagerungen in die tangential Knorpelschicht mit Verminderung der Proteoglykanbildung zu erkennen sind, zeigen sich in den Defekten II und III auch interne Strukturabnormalitäten und ein stärkerer Verlust von Proteoglykanen mit abnormalen Matrixkomponenten wie Alkalische Phosphatase und Kollagen Typ X (Defekt III). Im Defekt selbst sind trotz des Nachweises von Proteoglykanen keine knorpelspezifischen Strukturen oder sogar Alkalische Phosphatase sowie Kollagen Typ X nachweisbar. Die Qualität eines Knorpelpräparates gemessen anhand des M- Scores ist stark abhängig von der Lokalisation in situ. Je weiter zentral im

Defektgebiet und isolierter vom intakten Knorpelverbund, desto höher der M- Score und je schlechter die Knorpelqualität. Zu beachten ist dies bei der Bewertung von Gütekriterien z.B. der ACT/ Tissue Engineering, da die Lokalisation des Defektes für die Beschreibung genauer differenziert werden muss, z.B. zentrales oder peripheres Defektgebiet.

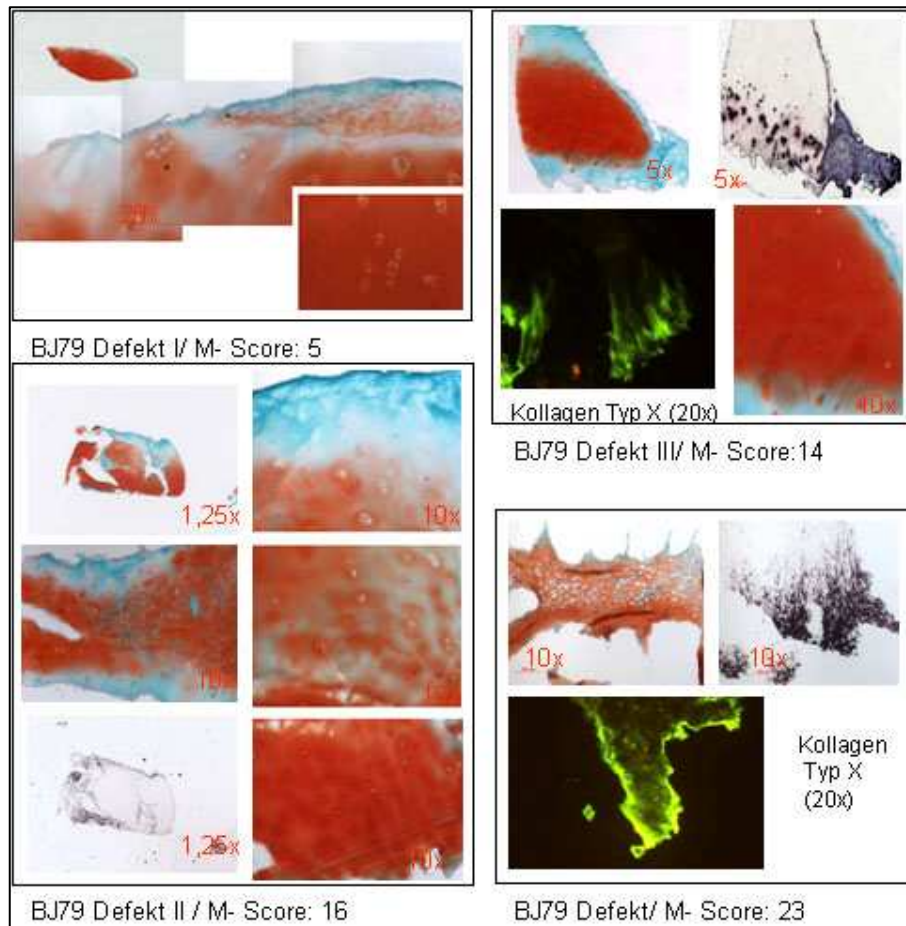


Abb. 34:
BJ79 Defekt
verschiedene M-
Scores

7.2.2.4. Gegenüberstellung von Notch ML57 und Notch EM84

Abschließend gelangen zwei Notch- Präparate zur Darstellung, die aus OCD- Gelenken und ursprünglich aus unbelastetem bzw. gesundem Gelenkknorpel der interkondylären Region stammen. Trotzdem sind erhebliche Schädigungen zu verzeichnen.

Besondere Erwähnung sollte der schlechte M- Score von ML57 (Abb. 35) mit einem Wert von 15 finden. Aber auch die Notch EM84 (Abb. 36) mit einem M- Score von 8 stellt kein gesundes Knorpelgewebe dar. Auffällig sind bei ML57 der generalisierte Verlust der Basophilie und Anfärbbarkeit für Proteoglykane. Im Präparat von EM84 stellt sich dies nur für die oberflächliche Knorpelschicht dar. Die superfizielle Schicht wird von einem mehrlagigen, lockeren und zellhaltigen Bindegewebe gebildet, während sie in der Notch

EM84 sogar fehlt. Demaskierte Kollagenfasern und eine aufgelockerte, tangential Schicht beinhalten nur wenige Zellen in einer undeutlichen, knorpelspezifischen Architektur. Während der Präparation löst sich der Knochen vom Knorpel. Trotzdem ist im Bereich der Tidemark eine bindegewebige Struktur erkennbar, die ein Chondron (Abb. 35, 40x HE) erfasst. In diesem Bereich befindet sich auch die Kollagen Typ I Immunfluoreszenz. Die Notch EM84 zeigt weiterhin vor allem in der mittleren Knorpelschicht eine vermehrte Anzahl von Zellen, die sich diffus vermehren.

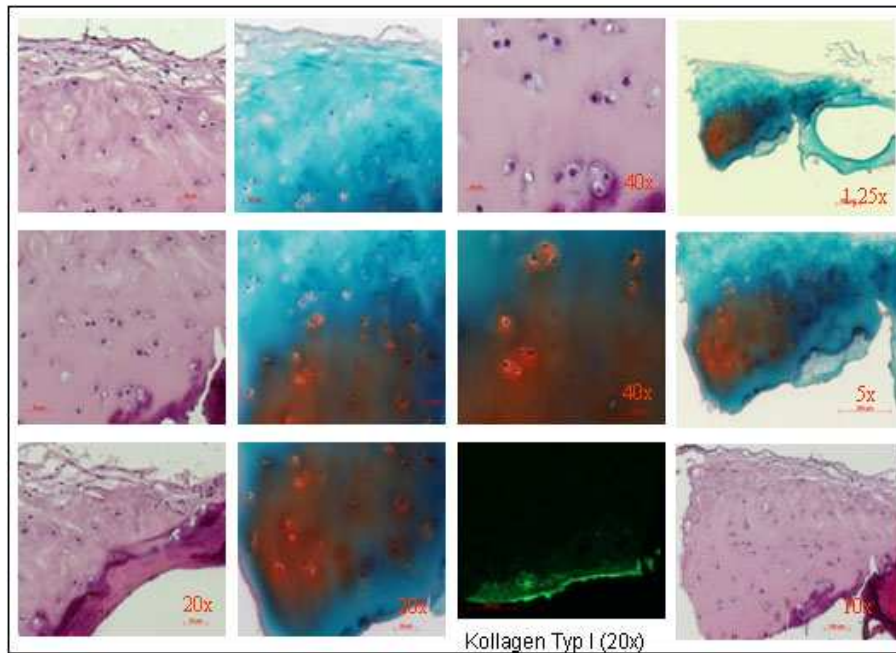


Abb. 35:
ML75 Notch
M- Score 15

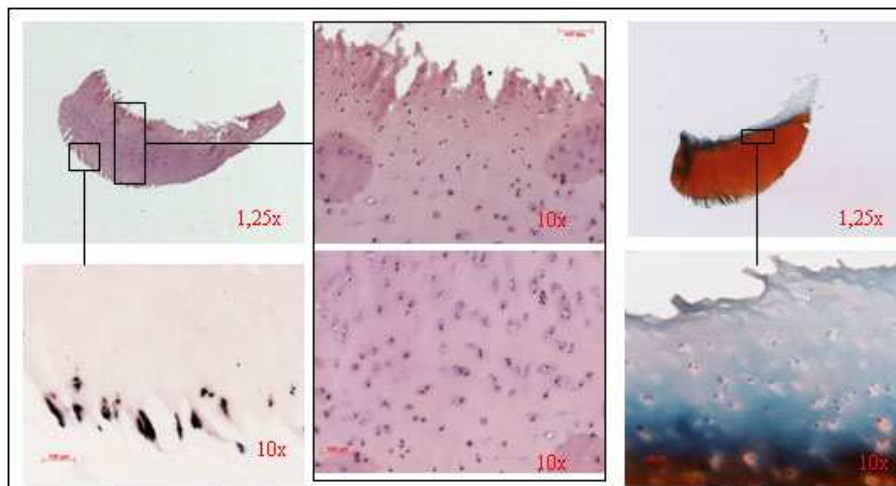


Abb. 36:
EM84 Notch
M- Score: 8

7.2.3. Zusammenfassung

Ausgehend vom individuell stark heterogenen Knorpelgewebe kommen vielfältige Bilder in dieser Auswertung zum Ausdruck, die Zeichen der Osteoarthrose zeigen und zum Teil sehr stark degenerativ verändert sind. So können stark degenerative Knorpelveränderungen wie eine generalisierte Verringerung der Anfärbbarkeit der Proteoglykane, asbestfaserige Degenerationen, das Fehlen einer typischen Knorpelarchitektur, Ulzerationen, Vergrößerung der Spongiosa mit Knochennekrose, die verwaschene Grenze zwischen Knochen und Knorpel sowie eine atypische Mineralisation als Keimzentrum dargestellt werden. Vor allem im Defekt, Defektrand und Mausbett, d.h. dem residualen Knorpelgewebe, können diese Veränderungen stärker als im Flake und Dissekat vorgefunden werden. Durch den hohen M- Score dieser Kollektive bestätigt sich der große Einfluss osteoarthrotischer Prozesse. Die Betrachtung der Dissekate und Flakes ergab, dass die superfizielle Schicht aller Dissekate durch Bindegewebseinlagerung selten - auflagerungen umgeformt und ärmer an Proteoglykanen sind. Tiefer reichende Proteoglykanverluste sind nur in einigen Fällen vorhanden. Wiederholt werden hypertrophe, clusterartige Chondrozyten tidemarknah ohne strukturelle Konformation gefunden. Die Korrelation von hypertrophen Clustern mit dem Nachweis von Kollagen Typ X und Alkalischer Phosphatase ist selten erfolgreich. Besonders häufig fallen die Flakes durch einen kompletten Strukturverlust auf. Außerdem spielt die Morphologie des subchondralen Knochens eine bedeutende Rolle.

7.3. Auswertung der RT- PCR

Die während der Operation entnommenen Knorpelstücke sind in fünf Kollektive eingeteilt worden. Knorpelzellen der OCD- Notch, der Trauma- Notch, des Dissekates, des Defektes und des Knorpelflakes werden in ihren molekularbiologischen Eigenschaften untersucht und miteinander verglichen. Die Definition der Lokalisationen erfolgt in Kap.7.2. . Der Nachweis von Expression beweist die Vitalität der untersuchten Knorpelzellen. Folgende Auswertung verdeutlicht die enorme Variabilität der Knorpelzellen in vivo und unter Zellkulturbedingungen in vitro. Die Auswertung auf m-RNA- Ebene als semiquantitative Methode, wie sie im Kap.6.6.2.5.und im Kap.6.6.2.6. beschrieben wurde, korreliert nicht mit den Untersuchungen der zeitlich später durchgeführten, quantitativen PCR (Abb. 37).

Deshalb erfolgt im nachstehenden Ergebnisteil der RT-PCR die Evaluierung deskriptiv an der Signalstärke der GAPDH und des Markers MLpuc19 des photographierten Gelbildes.

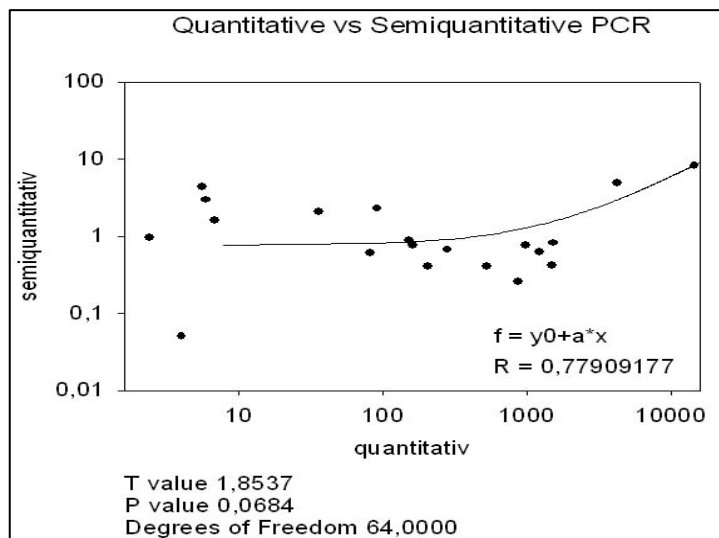


Abb. 37:
Korrelation der
quantitativen mit den semi-
quantitativen Ergebnissen

7.3.1. Synopsis

Für die Eingangskontrollen der OCD- Notch, d.h. der RT-PCR vor der Zellkultur, standen neun Proben, für die der Trauma- Notch drei, für das Dissekat acht, für den Defekt drei und lediglich eine für die des Flakes zur Auswertung an. Die Eingangskontrollen (Abb.38+39) zeigen Gemeinsamkeiten v.a. im Gehalt des Typ II Kollagens und des Aggrekans. Während Kollagen Typ II in fast allen Proben prominent auftritt, ist für Aggrecan in allen Banden eine geringere Signalstärke kennzeichnend.

Atypische Knorpelkollagene wie Typ I und Typ X differieren dagegen stärker. Sie erfahren, gemessen an der Bandenintensität, eine geringere Expression als Kollagen Typ II. In den Eingangskontrollen wird Kollagen Typ I fast in allen Proben exprimiert. Kollagen Typ X zeigt sich ebenfalls bis auf die Trauma- Notch in fast allen Eingangskontrollen und besonders stark im Defekt. Wachstumsfaktoren werden in den Eingangskontrollen relativ gering nachgewiesen. Vor allem BMP- 7 und IL- 1 kommen kaum zur Ausprägung. Das Flake, die Trauma- Notchzellen und die Defektzellen zeigen mehr IL- 1- Banden auf als die OCD- Notch und das Dissekat. TGF- β , bFGF und VEGF zeichnen sich jedoch durch eine höhere Expression und stärkere Banden aus. TGF- β wird beispielsweise in der OCD- Notch, im Dissekat und im Flake häufig stärker detektiert als die GAPDH, so dass von einer knorpelprotektiven Regulation ausgegangen werden kann. Die Besonderheit der Trauma- Notch liegt gegenüber den restlichen Kollektiven in den geringeren

Transkriptionsmengen für TGF- β , bFGF und VEGF. Dabei zeigt sich auch im Defektgewebe korrelierend zur Trauma- Notch eine offensichtlich geringere TGF- β -Menge. Überraschenderweise wird in keiner der Einzelproben der Trauma- Notch VEGF nachgewiesen.

Zusammenfassend kann über die gesamten Daten der Ausgangskontrollen (Abb. 38+39) von neun OCD- Notch- Proben, vier Trauma- Notch-, acht Dissekat-, drei Defekt- und drei Flake- Proben eine, für die ACT wünschenswerte Homogenisierung unter Zellkulturbedingungen festgestellt werden (Abb. 38+39). Die fünf Kollektive erreichen infolge der Homogenisierung unter in- vitro- Bedingungen für die jeweiligen m- RNA- Transkripte ähnliche Bandenmuster. Unter den Bedingungen der Zellkultur zeigt sich eine Reduktion von Kollagen Typ II, X und Aggrecan. Auch werden die Wachstumsfaktoren bFGF und VEGF deutlicher demonstriert. Die TGF- β - Banden nehmen nach der Zellkultur an Stärke und Anzahl zu. Dagegen erfolgt kaum eine Veränderung beim BMP-7. IL- 1 wird nach der Zellkultur nur vereinzelt in geringer Stärke dokumentiert. Für Kollagen Typ I werden nach der Kultivierung in der Trauma- Notch, im Defekt und im Flake deutliche Zunahmen im Vergleich zur jeweiligen Eingangskontrolle verzeichnet. Die, während der Zellkulturbedingungen beobachteten Trends sollen im nachfolgenden Teil innerhalb der Kollektive als Vergleich näher beleuchtet werden.

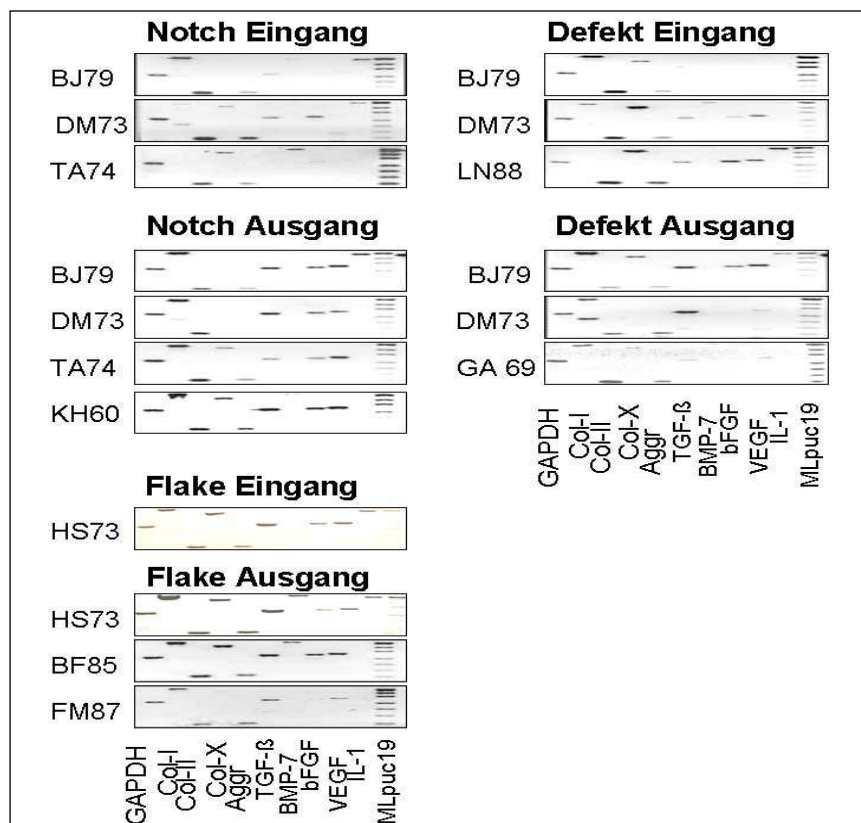


Abb. 38:
Gelbilder der RT- PCR
von Trauma- Notch,
Defekt und Flake

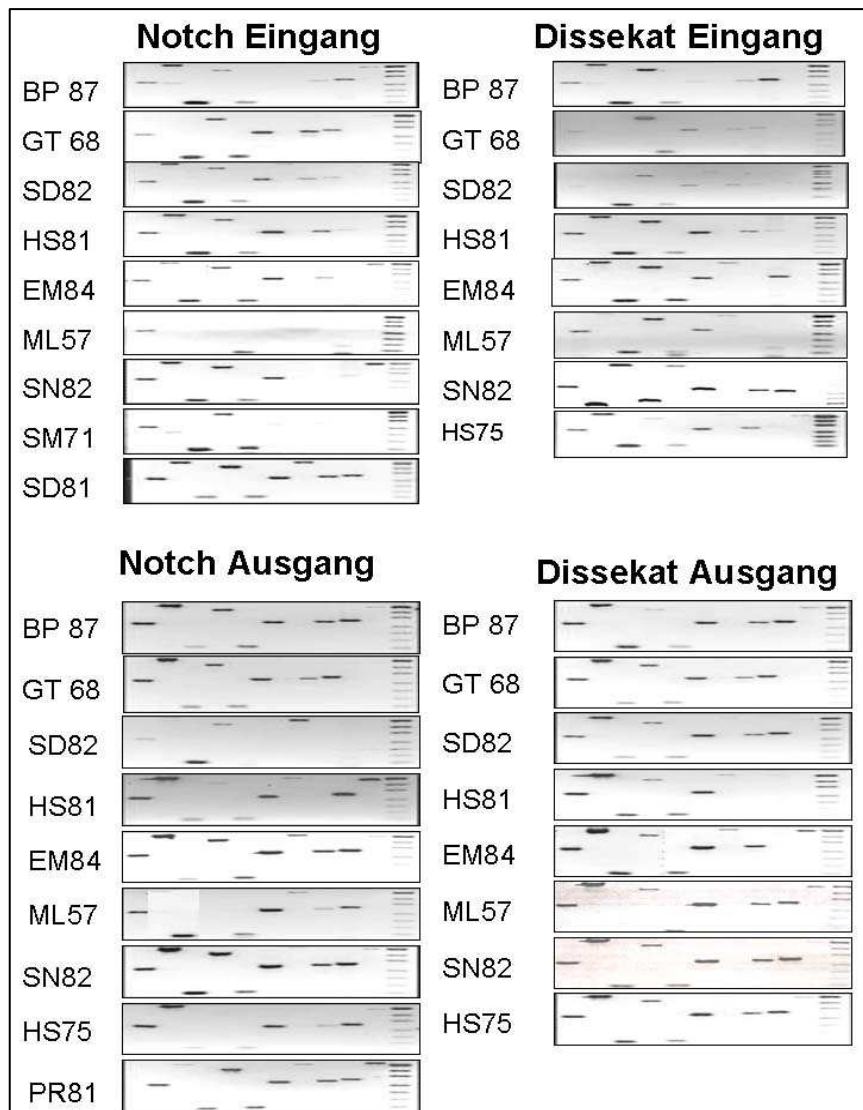


Abb. 39:
Gelbilder der RT-PCR
von OCD- Notch und
Dissekat

7.3.2. Vergleich innerhalb der Kollektive

7.3.2.1. Trauma- Notch vs. OCD- Notch

Vor der Zellkultur unterscheiden sich OCD- und Trauma- Notch (Abb.38+39) in der Expression extrazellulärer Matrixkomponenten bis auf den deutlich stärkeren Nachweis von Kollagen Typ X in der OCD- Notch kaum. Innerhalb der Wachstumsfaktoren zeigen sich größere Unterschiede. TGF- β , bFGF und VEGF werden deutlich stärker in der OCD- Notch exprimiert. Die Dezymierung von Kollagen Typ II und Aggrecan unter den Bedingungen der Zellkultur folgt dem allgemeinen Trend. Dabei ist der besonders starke Rückgang von Kollagen Typ II sowie für Aggrecan in der OCD- Notch gegenüber der Trauma- Notch zu beachten. Nach der Zellkultur steigen Kollagen Typ I, X, TGF- β , und

bFGF und in besonderem Maße VEGF in der Trauma- Notch sowie bis auf Kollagen Typ X auch in der OCD- Notch relativ stark an. Aber Kollagen Typ I ist im OCD- Notch- Ausgang nicht in allen Proben positiv. Dort, wo jedoch Kollagen Typ I detektiert wird, ist eine relativ starke Bande festzustellen.

Nach der Kultivierung sind einheitlichere Bandenmuster im Sinne von homogeneren Daten zwischen der OCD- und Trauma- Notch zu erkennen.

7.3.2.2. Dissekat vs. Flake

Der Vergleich der Expressionsmuster (Abb.38+39) von Dissekat und Flake ergibt bis auf die stärkere Expression von Kollagen Typ II im OCD- Eingang kaum Unterschiede. Deutlicher ist im Flake die Expression von Wachstumsfaktoren, die nach der Kultivierung in beiden Kollektiven ähnliche Bandenmuster ergibt. Unter den Bedingungen der Zellkultur verhalten sich beide Kollektive gleich und entsprechend dem allgemeinen Trend, so dass sich die ohnehin schon geringen Differenzen in den Ausgangskontrollen auflösen. Bemerkenswert ist die Tatsache, dass im Flake- Ausgang zwei Proben deutlich positiv sind für BMP- 7.

7.3.2.3. OCD- Notch vs. Dissekat

Im Vergleich des Expressionsmusters (Abb.39) von OCD- Notch und Dissekat fallen kaum Unterschiede auf. Auch nach der Zellkultur zeigen sich nur geringe Differenzen. Hierfür wird die identische Ätiologie der beiden Kollektive verantwortlich gemacht.

Unbedeutend größere Transkriptmengen ergeben sich für Kollagen Typ I, X und VEGF im Dissekat. Aggrekan wird im Dissekat geringer exprimiert. Gemeinsamkeiten ergeben sich für die Transkriptionsraten von TGF- β und ferner auch für BMP-7, bFGF, VEGF und IL- 1. Unter in- vitro- Bedingungen werden für die OCD- Notch und das Dissekat überwiegend vergleichbare Tendenzen ermittelt. Dazu zählen die Abnahmen für Kollagen II, Aggrekan und Kollagen Typ X. Beide Kollektive verändern unter Zellkulturbedingungen kaum ihr Expressionsmuster für Kollagen Typ I, TGF- β und IL-1.

7.3.2.4. Trauma- Notch vs. Flake

Als Korrelat zum Vergleich zwischen OCD- Notch und Dissekat wird der Vergleich zwischen Trauma- Notch und Flake (Abb. 38) verwendet. Das Flake zeigt deutlich größere Unterschiede zur Trauma- Notch als das Dissekat zur OCD- Notch. Vor allem Kollagen Typ II, X, TGF- β , bFGF und VEGF zeigen Abweichungen in den Eingangskontrollen. Während sich für TGF- β , bFGF und VEGF in den OCD- Geweben ausgeglichene Verhältnisse ergeben, stellen sich für das Flake deutlich größere Mengen, als in der Trauma- Notch dar. Unter den Bedingungen der Zellkultur, die dem allgemeinen Trend folgen, werden die Expressionsmengen zwar homogener, können aber nicht das einheitliche Bild von OCD- Notch und Dissekat in den Ausgangskontrollen zeigen. Besonderes Augenmerk ist auf den Anstieg der Expression von VEGF, TGF- β und bFGF in den Ausgangskontrollen der Trauma- Notch zu legen.

7.3.2.5. Trauma- Notch vs. Defekt

Im Gehalt von Kollagen Typ I und X zeigen Trauma- Notch und Defekt (Abb. 38) größere Unterschiede, denn im Defekt sind jeweils deutlich höhere Transkriptmengen der knorpeluntypischen Matrixkomponenten nachweisbar. Kollagen Typ X ist demzufolge nicht spezifisch für die OCD, weil es sich in OCD- Notch und Dissekat gleichermaßen befindet. Es ergeben sich kaum Unterschiede zwischen Defekt und Trauma- Notch in der Expression von Kollagen Typ II und Aggrekan.

Nach der Zellkultur bestehen im Sinne einer Homogenisierung nur geringe Unterschiede zu den restlichen Kollektiven. Allerdings ist ein starker Nachweis von Kollagen Typ I, TGF- β , bFGF und VEGF im Trauma- Notch- Ausgang zu verzeichnen, die in allen Proben, gegenüber dem Defekt- Ausgang relativ homogen erscheinen.

Das Expressionsmuster der Trauma- Notch und der Vergleich zu den in- vitro- Daten stellen dar, dass das Trauma- Notch- Kollektiv mit seinem hohen Anteil an knorpelspezifischer Matrix, durch den sehr geringen Anteil an unspezifischer Matrix und an Wachstumsfaktoren gesundem Knorpel entsprechen könnte und sich unter dem Einfluss der Zellkultur Regenerationsmechanismen manifestieren, die dem Prozess der Stimulierung und Homogenisierung unterliegen.

7.3.3. Darstellung ausgewählter Einzelproben

Im Folgenden werden drei OCD- Proben und zwei Trauma- Proben dargestellt, die in allen vier Kollektiven vollständig auswertbar sind, denn nur in der Betrachtung der individuellen Expressionsmuster können spezifische Aussagen über die Bandbreite der Expression und das Verhalten nach der Zellkultur getroffen werden. Obwohl bei der Betrachtung der Gesamtdaten spezifische Trends aufgezeigt werden konnten, zeigt sich individuell eine große Variabilität, die im Folgenden beleuchtet werden soll.

Die folgenden Gelbilder sind standardisiert an der GAPDH und dem Marker MLpuc19. Isolierte Vergleiche der Banden erlangen unter Berücksichtigung der GAPDH- und Marker- Signal- Stärke ihre Aussagekraft.

7.3.3.1. OCD- Einzeldarstellungen

7.3.3.1.1. BP87 OCD- Notch und Dissekat

Das Bandenmuster der Proben von BP87 zeigt mit nur wenigen Ausnahmen Ähnlichkeiten zwischen den beiden Kollektiven Notch und Dissekat sowie dem Verlauf der Zellkultur. Unterschiede ergeben sich durch den Vergleich der Ein- und Ausgangskontrollen, die jedoch dem beobachteten, allgemeinen Trend unter Zellkulturbedingungen entsprechen. Ein grober Vergleich der Bandenmuster beider Eingangskontrollen (Abb. 40) zeigt ein homogenes Bild. Unterschiede bestehen im deutlich stärkeren Nachweis von Kollagen Typ X und VEGF im Dissekat und dem schwachen Expressionsnachweis von TGF- β sowie dem Fehlen von IL-1. Auffällig ist der starke Nachweis von Kollagen Typ II im Notch-Eingang, der im Dissekat ebenfalls relativ stark ausgeprägt ist. Im Vergleich zur Eingangskontrolle ist ein extremer Verlust von Kollagen Typ II im Notch- Ausgang zu verzeichnen. Auch im Dissekat zeigt sich die Tendenz, Kollagen Typ II nach der Zellkultur zu verlieren, jedoch nicht so stark wie in der Notch. Kollagen Typ I wird geringfügig mehr im Notch- Eingang als im Dissekat- Eingang, exprimiert, und Kollagen Typ X viel stärker im Dissekat- Eingang. Bei letzterem erfolgt nach der Zellkultur erstaunlicherweise eine starke Reduktion der Kollagen Typ X Expression, während in der Notch eine Zunahme erfolgt. Die Notch und das Dissekat weisen kein BMP- 7 auf und die Notch-Eingangskontrolle zusätzlich kein TGF- β . TGF- β , bFGF und VEGF steigen unter den Zellkulturbedingungen in beiden Kollektiven an, so dass unter den Wachstumsfaktoren nach der Zellkultur ein ähnliches Banden- bzw. Expressionsmuster entsteht. IL-1 wird in

beiden Kollektiven nach der Zellkultur schwach nachgewiesen. Unterschiede bestehen im Ausgang in der stärkeren Expression von Kollagen Typ X und Aggrecan in der Notch sowie im stärkeren Kollagen Typ II- Gehalt des Dissekates.

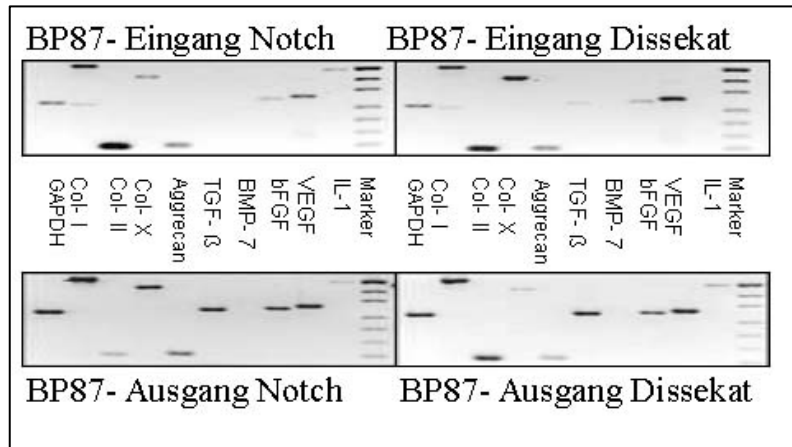


Abb. 40: Gelbild der OCD-Einzelprobe von BP87

7.3.3.1.2. GT68 OCD- Notch und Dissekat

Das Expressionsmuster von GT68 (Abb. 41) weist im Gegensatz zum Expressionsmuster von BP87 (Abb. 40) vor der Zellkultur in Notch und Dissekat größere Differenzen auf als nach der Zellkultur, da auch bei diesen Proben von einer Homogenisierung unter der Kultivierung ausgegangen werden muss. Die Probe GT68 zeigt in den Eingangskontrollen deutlich mehr Inhomogenitäten (Abb. 41) als BP87 (Abb. 40). Erstaunlicherweise findet sich kein Nachweis für Kollagen Typ I und II im Dissekat. Dafür fällt der Nachweis von Typ X Kollagen deutlicher als in der Notch aus. Auffällig sind die sehr prominenten Aggrecan- und Kollagen Typ X Banden im Dissekat- Eingang sowie die Banden von Kollagen Typ II und der Wachstumsfaktoren TGF- β , bFGF und VEGF im Notch- Eingang.

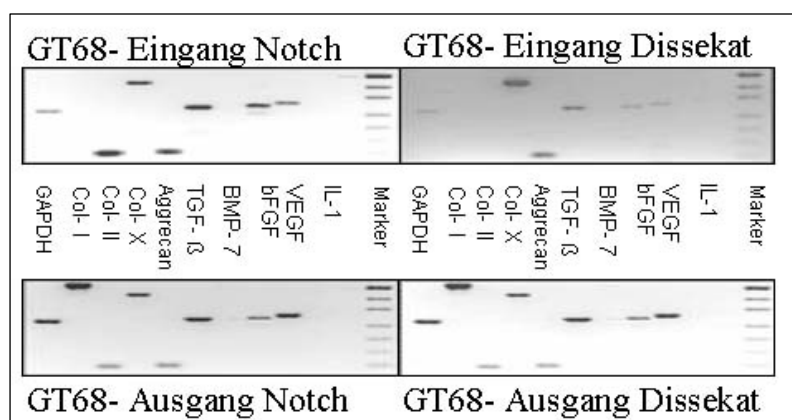


Abb. 41:
Gelbild der OCD-Einzelprobe von GT68

Nach der Zellkultur zeigen sich in beiden Ausgangskollektiven homogenere Bandenmuster. Es findet eine Verringerung von Kollagen Typ II, Aggrecan und Kollagen Typ X statt. Kollagen Typ I nimmt dagegen in beiden Kollektiven zu. Die Wachstumsfaktoren bleiben gemessen an der Bandenstärke der GAPDH konstant. BMP- 7 kann in Notch und Dissekat nicht dargestellt werden. Besonders hinzuweisen ist auf die fehlende IL- 1 Expression in Notch und Dissekat- Ausgang.

7.3.3.1.3. HS81 OCD- Notch und Dissekat

Das Bandenmuster von HS81 (Abb. 42) verhält sich unterschiedlich zu denen von BP87 (Abb. 40) und GT68 (Abb. 41). Die homogenen Expressionsmuster vor der Zellkultur weichen vor allem für die Wachstumsfaktoren nach der Zellkultur stärker auseinander. Die Proben von HS81 (Abb. 42) verhalten sich unter den Bedingungen der Zellkultur, für Kollagen Typ II und Aggrecan dem allgemeinen Trend entsprechend. Der Anteil an Kollagen Typ II und Aggrecan vor der Zellkultur nimmt unter dieser relativ stark ab. Auch die Kollagene Typ I und X sind in beiden Eingangskollektiven stark vertreten. Ihr Verhalten nach der Zellkultur divergiert, so dass eine Zunahme von Typ I und eine Abnahme von Typ X Kollagen in beiden Kollektiven zu beobachten ist. Dieses relativ homogene Bild der extrazellulären Matrix beider Ausgangskontrollen kann nicht auf die Wachstumsfaktoren übertragen werden, denn hier zeigen sich relativ starke Abweichungen zu den homogenen Eingangskontrollen. Zu beachten ist der sehr selten vorkommende Nachweis von BMP-7 in beiden Kollektiven nach der Zellkultur. TGF- β wird in den Ausgangskontrollen weniger nachgewiesen. VEGF und IL- 1 zeigen eine starke Expression in der Notch- Ausgangs- kontrolle, die im Dissekat nicht erfolgt. In letzterem zeigen sich bis auf TGF- β und BMP-7 keine Banden von Wachstumsfaktoren.

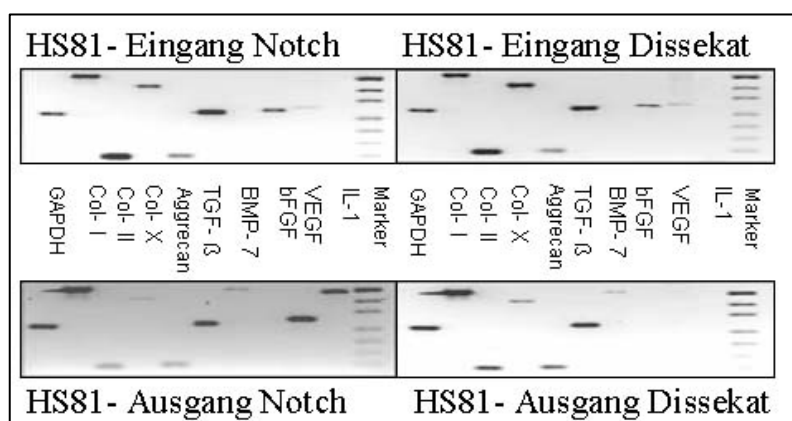


Abb. 42 :
Gelbild der OCD-
Einzelprobe von HS81

bFGF zeigt sich im Unterschied zu den restlichen Ausgangsproben (Abb. 38+39) nicht. Nach der Zellkultur kann nicht generell von einer Homogenisierung ausgegangen werden, da die Eigenschaften von Dissekat und Notch insbesondere bei den Wachstumsfaktoren zu stark voneinander abweichen. Im Unterschied dazu sind sich jedoch die beiden Eingangskontrollen relativ ähnlich.

Zusammenfassend zeigt sich bei der Betrachtung der drei Dissekat- Proben eine relativ große Bandbreite an Expressionsmustern. Für BP87 (Abb. 40) kann innerhalb der Probe für Notch und Dissekat ein relativ homogenes Bild angegeben werden, das auch nach der Zellkultur Bestand hat. In der GT68- Probe (Abb. 41) offenbart sich dagegen eine völlige Inkongruenz beider Proben, die aber bei Betrachtung der Ausgangskontrollen kaum Unterschiede aufweisen. Und schließlich zeigt HS81 (Abb. 42) bis auf einige Transkripte der Eingangskontrollen kaum Gemeinsamkeiten im spezifischen Verlauf der Zellkultur auf. Diese Darstellung der einzelnen Proben veranschaulicht eine Bandbreite individueller Merkmale, die in ihrer Gesamtheit das Einzigartige dieser Untersuchung widerspiegelt und grundsätzliche Tendenzen darin vereinigt.

7.3.4.1. Trauma- Einzeldarstellungen

7.3.4.1.1. BJ79 Trauma- Notch und Defekt

Der Überblick über die Ein- und Ausgangskontrollen von Notch und Defekt (Abb. 43) zeigt relativ homogene Bandenmuster, die nur durch wenige Ausnahmen wie z.B. Kollagen Typ X voneinander abweichen und auch nach der Zellkultur ähnliche Reaktionen auf die Stimulation der Zellkultur aufweisen.

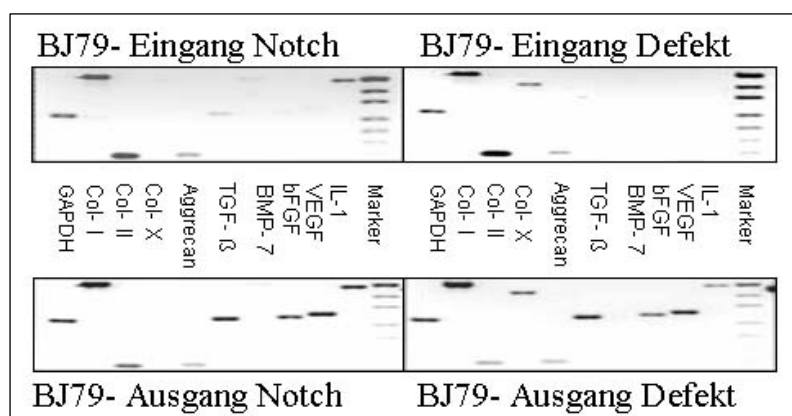


Abb. 43:
Gelbild der Trauma-
Einzelprobe
von BJ79

Sehr viel Kollagen Typ II und relativ viel Aggrecan können im Notch und vor allem im Defekt- Eingang wie auch Kollagen Typ I dargestellt werden. Kollagen Typ X fehlt dagegen in der Notch Eingangs- und Ausgangskontrolle. Im Defekt wird Typ X Kollagen vor und nach der Kultivierung ungefähr gleich stark detektiert. Wachstumsfaktoren werden in Notch und Defekt vor der Zellkultur äußerst gering und nach der Zellkultur dagegen nicht exprimiert. Allerdings ist IL-1 im Notch- Eingang und Ausgang zu finden, während es im Defekt nur nach der Zellkultur und zudem wesentlich geringer nachgewiesen wird. Der Notch- und Defekt- Ausgang zeigt die Steigerung der Wachstumsfaktoren TGF- β , bFGF und VEGF sowie IL-1. Bis auf das geringer exprimierte Kollagen Typ X verhalten sich demnach Notch und Defekt sehr ähnlich.

7.3.4.1.2. DM73 Trauma- Notch und Defekt

Der Vergleich der Bandenmuster aller vier Proben von DM73 (Abb. 44) fällt deutlich heterogener aus als der von BJ79 (Abb. 43) aus. Bis auf Kollagen Typ I und X der Defekt- Eingangskontrollen sind die Expressionsmuster der extrazellulären Matrix der beiden Proben fast identisch. Im Defekt wird Typ I und X Kollagen stärker nachgewiesen als in der Notch. Die Wachstumsfaktoren zeigen bis auf TGF- β deutliche Unterschiede. Es werden BMP-7 und VEGF im Defekt, sowie IL- 1 und bFGF in der Notch detektiert. TGF- β steigt unter der Zellkultur besonders im Defekt an. Dort werden allerdings bis auf den schwachen Nachweis von VEGF keine Wachstumsfaktoren dargestellt. Dazu gegensätzlich zeigt sich das Bandenmuster der Notch- Ausgangskontrolle, wo sich bFGF und VEGF relativ stark darstellen. Insgesamt kann in den Ausgangskontrollen nicht von einer Homogenisierung ausgegangen werden.

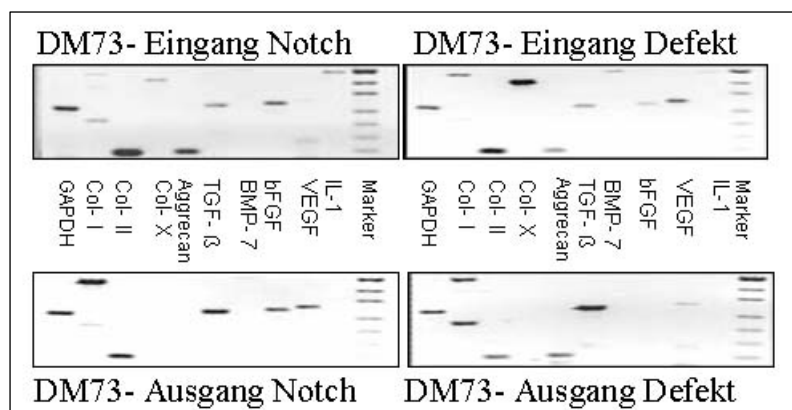


Abb. 44:
Gelbild der Trauma-
Einzelprobe von DM73

Zusammenfassend kann auch in den Trauma- Proben eine große Individualität der Einzelproben und damit eine große Bandbreite der Expressionsmuster festgestellt werden. Während sich in den Proben von BJ79 (Abb. 43) nur geringe Unterschiede nachweisen lassen, zeigen sie sich in der Darstellung von DM73 (Abb. 44) umso stärker.

7.4. Vergleich von Histologie/ Immunhistochemie und RT- PCR

Im Folgenden soll eine Gegenüberstellung von Histologie und RT- PCR, d.h. von histologischem Phäno- und Genotyp stattfinden.

7.4.1. BJ79 Defekt- Eingang



Abb. 45:
Profil BJ79
Defekt- Eingang

Die in Abschnitt 7.2 Abb. 34 dargestellte Histologie des Defektes BJ79 wurde molekularbiologisch evaluiert und soll nachfolgend Verbindungen zwischen Geno- (Abb. 45, Abb.38) und Phänotyp (Abb. 34) beschreiben.

Abhängig von der Defektlokalisierung imponiert histologisch das Bild eines Defektes mit knorpeltypischer Struktur und starker Proteoglykansynthese bis zum knorpeluntypischen, fibrösen Präparat mit Verlust von Proteoglykanen und dem Nachweis von Kollagen Typ X. Das Expressionsprofil zeigt den Querschnitt aus allen vier Präparaten. Neben dem starken Nachweis von Kollagen Typ I und II werden Kollagen Typ X und Aggrecan nur gering detektiert. Von den Wachstumsfaktoren gelangt TGF- β äußerst schwach zur Ausprägung. Diskrepanzen zwischen Histologie und RT- PCR zeigen sich für Kollagen Typ I, welches sehr stark exprimiert wird, aber in der Immunfluoreszenz nicht detektiert werden kann. Die genaue in situ- Lokalisation des zur RT- PCR zugeführten Knorpelpräparates ist nicht bekannt und symbolisiert wahrscheinlich im PCR- Profil in einer Momentaufnahme des molekularbiologischen Stoffwechsels einen gewissen Querschnitt durch die gezeigten Histologien, zumal das Expressionsmuster aller Knorpelschichten in seiner Gesamtheit dokumentiert wird. Schlussfolgernd handelt es sich bei dem Präparat BJ79 molekularbiologisch und histologisch um ein relativ stark geschädigtes Knorpelstück.

7.4.2. DM73 Defekt- Eingang



Abb. 46 :
Profil DM73
Defekt- Eingang

Demgegenüber stehen die verminderten qualitativen Knorpel Eigenschaften von DM73 (Abb. 46). Obwohl die Expression von Kollagen Typ II und Aggrecan relativ stark ist, zeigen sich auch deutlich untypische Matrixkomponenten sowie alle Wachstumsfaktoren. Besonderes Augenmerk ist auf die extreme Menge an Kollagen Typ X zu legen. Molekularbiologisch können viel mehr Kollagen Typ X, mehr Aggrecan sowie die Wachstumsfaktoren TGF- β , BMP-7, bFGF und VEGF und weniger Kollagen Typ I nachgewiesen werden wie bei BJ79 (Abb. 45). Histologisch präsentiert sich das Präparat mit einem relativ starken Verlust von Proteoglykanen, oberflächlichen Erosionen und diffus, verteilten hypertrophen Clustern. Die RT-PCR als Profil aller Knorpelschichten weist auf eine enorme, degenerative Schädigung hin, die bis auf die fehlende Kollagen Typ I, X und Alkalische Phosphatase- Detektion dieses Bild bestätigt.

7.4.3. HS73 Flake und EM84 Dissekat- Eingang



Abb. 47: Profil HS73 Flake- Eingang



Abb. 48: Profil EM84 Dissekat- Eingang

Flake und Dissekat besitzen unterschiedliche Ursachen für ihre Ablösung aus dem Verbund Gelenkknorpel. Deshalb wird eine größere Bandbreite histologischer und molekularbiologischer Erscheinungen vermutet. Tatsächlich ergibt sich bei den Präparaten von HS73 (Abb. 47+ 22) und EM84 (Abb. 48+30-32) keine größere Diskrepanz. Der Vergleich der Präparate von HS73 (Abb. 47) und EM84 (Abb. 48) ergibt sehr hohe Expressionsmengen der knorpeltypischen Matrix wie Kollagen Typ II und Aggrecan, sowie einen starken Nachweis von Kollagen Typ I und X. Die Wachstumsfaktoren und auch IL-1 sind vor allem im Flake deutlich dargestellt. Allerdings widerspricht dieses molekularbiologische Korrelat dem der Histologie. Das Flake HS73 zeigt zwar oberflächliche Erosionen und eine erhöhte Zellularität, seine Struktur ist jedoch mit einem M- Score von 6 von relativ guter Qualität. Im Dissekat EM84 (M- Score 9) ist der Proteoglykanverlust geringfügig stärker, und die Zellen sind stellenweise hypertropher als bei HS73. Immunhistochemisch können in beiden Präparaten kein Kollagen Typ I, X oder Alkalische Phosphatase nachgewiesen

werden. Diese beiden Proben mit ähnlichem Expressionsmuster erlauben keinen Rückschluss auf die Qualität der Histologie, da sich größere Differenzen zwischen Geno- und histologischem Phänotyp ergeben.

7.4.4. HS75 Dissekat- Eingang



Abb. 49 :
Profil HS75
Dissekat- Eingang

Besonders eindrucksvoll stellt sich auch der Vergleich der Histologie von HS75 (Abb. 21+49) mit einem M- Score von 19 und seinem Expressionsmuster dar. Der histologisch schwer geschädigte Knorpel zeigt dennoch ein Expressionsmuster mit viel Kollagen Typ II, verminderter Aggrecan- Expression, einem sehr minimalen Kollagen Typ X- und einem deutlichen Kollagen Typ I- Nachweis. Letzterer korreliert eher mit dem histologischen Bild, obwohl Kollagen Typ X histologisch detektiert werden konnte und Kollagen Typ I nicht. Die Wachstumsfaktoren zeigen bis auf VEGF ein für die Gruppe der Dissekte durchschnittliches Profil. Schlussendlich überrascht das histologische Präparat, welches gekennzeichnet ist durch den kompletten Verlust von Proteoglykanen und dem Fehlen von Zellen mit einer enormen und vielfältigen Expression.

7.4.5. EM84 Notch- Eingang



Abb. 50:
Profil EM84
Notch- Eingang

Interessant gestaltet sich auch der Vergleich des Expressionsprofils EM84 (Abb. 50) der Notch mit seinem histologischen Korrelat (Abb. 36).

Es zeigt sich in der Histologie mit einem M- Score von 9 ein mäßig schwer geschädigter Knorpel, der oberflächliche Auffaserungen und Proteoglykanverluste bis zur tangentialen Schicht sowie eine diffuse Hyperzellularität aufweist. Kollagen Typ II und Aggrecan gelangen stark zur Ausprägung und bestätigen das mikroskopische Bild. Wiederholt ist auch in diesem Fall Kollagen Typ X im Expressionsprofil enthalten und kann immunhistochemisch nicht nachgewiesen werden. Die Wachstumsfaktoren TGF- β und bFGF sowie IL-1 werden für ein Notchgewebe erstaunlich stark exprimiert. Eine diffuse Hyperzellularität im histologischen Präparat könnte mit diesem PCR- Profil korrelieren.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass vom Expressionsmuster nicht auf das histologische Bild und umgekehrt geschlossen werden kann, da vielfältige Unterschiede gezeigt werden konnten. Es konnte bewiesen werden, dass eine enorme Variabilität und Vitalität vorherrscht.

7.5. Auswertung der Zellkultur

Im Rahmen der Qualitätssicherung der ACT wird empfohlen, die primäre Zellqualität innerhalb von 24 Stunden nach der Isolation aus dem Gewebe als Ausgangsbefund vor der Zellkultur durchzuführen. Auch nach der Zellkultur werden die molekularbiologischen Parameter bestimmt, um die Qualität der Zellkultur zu beurteilen. Neben den molekularbiologischen (Kapitel 7.3.) Parametern wurde zur Feststellung der Vitalität die Färbung mit Anilinblau verwendet. Die Vitalität der Zellen lag vor der Zellkultur bei durchschnittlich 94% und danach bei 95% in allen Kollektiven. In dieser Arbeit wurde eine zweidimensionale (Monolayer-) Kultur verwendet. Vorteil ist die schnelle Proliferation der Knorpelzellen bis zu dem Zeitpunkt, bis die Grenzen des Kulturmediums und der Zelldichte ausgeschöpft sind. In der durchschnittlichen Zellkulturdauer von 15,9 Tagen \pm 10 betragen die Generationszahlen der Notch 2,4, die des Dissekates 2, die des Defektes 2,9 und 2,7 für das Flake. Die Abb. 51 verdeutlicht den einheitlichen Anstieg der Zellzahlen nach der Zellkultur in allen Kollektiven gleichermaßen. Es wurden Zellzahlen der Größenordnung 10^5 – maximal 10^8 in der Zellkultur bearbeitet.

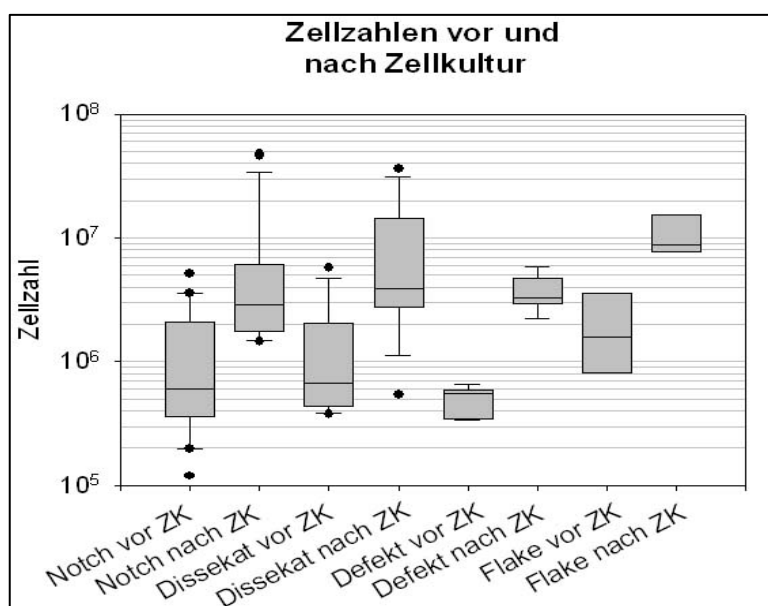


Abb. 51:
Zellzahlen vor und
nach der Zellkultur

8. Diskussion

In der vorliegenden Arbeit werden Knorpelzellen von traumatisch geschädigten und mit OCD befallenen Gelenken molekularbiologisch und histologisch sowohl vor als auch nach der Zellkultur untersucht. Es kann eine enorme Variationsbreite der Gelenkknorpelmorphologie dargestellt werden. Molekularbiologisch zeigt sich eine Desorganisation des Knorpelmetabolismus mit einem Nebeneinander von normalem, dedifferenziertem und hypertrophiertem Knorpel. Das mosaikartige Bild verschieden differenzierter Knorpelzellen weist insgesamt nach Isolierung aus dem Gewebsverband sowie nach der Zellkultur eine hohe Vitalität und Qualität verbunden mit einer enormen intrinsischen Reparaturkapazität auf.

Die Pathogenese der OCD ist weniger gut untersucht als die der OA (Sandell und Aigner 2001). Dies zeigt sich in der Tatsache, dass die Ätiologie der OCD letztlich nicht genau geklärt ist, was in zukünftigen Forschungen geleistet werden muss. Für die jeweiligen Gelenke ergeben sich unterschiedliche Ätiologien, die einerseits mikrotraumatisch und andererseits multifaktoriell zu sein scheinen. In der vorliegenden Arbeit bestätigt sich die ätiopathogenetische Besonderheit bei Befall der Patella, die durch rezidivierende Mikrotraumen mit einer Subluxationsstellung bzw. Lateralisation charakterisiert ist (Bruns 1996, Bruns und Steinhagen 2000), denn alle Fälle von OCD der Patella wiesen eine Patelladysfunktion auf. Fest steht bisher nur, dass jede OCD in eine Arthrosis deformans mündet (Axhausen 1954). Puhl beschreibt die OCD als Präarthrose (Puhl 1974). Besonders nach dem Schluss der Epiphysenfugen stellt ein isolierter Knorpelschaden einen wesentlichen Risikofaktor für das Entstehen einer OA dar (Bruns und Steinhagen 2000, Puhl 1974). Folglich kann festgehalten werden, dass Knorpelläsionen Prädiktoren einer OA darstellen, sobald sie die Tangentialfaserschicht überschreiten (Bruns und Steinhagen 2000, Mollenhauer und Aurich 2003). Die durch diese Arbeit insbesondere in den Histologien gefundenen arthritischen Veränderungen finden sich, beginnend mit dem Verlust von Proteoglykanen, sowohl in den Kollektiven von Trauma als auch in der OCD

Histologisch und molekularbiologisch präsentiert sich eine enorme Variabilität, die selbst im intakten und mehr noch im geschädigten Gelenk zu finden ist (Mankin et al. 1971, Aigner und McKenna 2002, Darling et al. 2004, Sandell und Aigner 2001, Guthrie et al. 1992). Obwohl Gelenkknorpel ein bradytrophes Gewebe ist, ergeben sich sogar innerhalb eines Gelenkes deutliche Unterschiede in Abhängigkeit vom Alter (Aurich et al. 2002) und

der Knorpeldicke sowie im Schichtenaufbau (Darling et al. 2004, Sandell und Aigner 2001, Bruns und Steinhagen 2000, Kaab et al. 1998) und im Metabolismus des einzelnen Gelenkes selbst (Aurich et al. 2005). Die Knorpelzellen reagieren nach Schädigung mit einer Steigerung der metabolischen Aktivität bis hin zur Hyperaktivität (Bruns und Steinhagen 2000, Buckwalter und Mankin 1997, Collins 1939, Collins und McElligott 1960).

Die Heterogenität in der vorliegenden Arbeit wird zusätzlich durch die fehlende Selektion des Spendermaterials beeinflusst. Dies bedeutet einerseits, dass alle Präparate mit der Diagnose Trauma und OCD untersucht wurden, und andererseits keine Unterteilung der beiden Gruppen in Alter, Geschlecht, Dauer der Beschwerden und Vorbehandlungen erfolgte. Vielmehr soll in der vorliegenden Arbeit ein Querschnitt der histologischen und molekularbiologischen Erscheinungsbilder zur Darstellung kommen. Die Entwicklung von Bewertungssystemen auf dem Boden einheitlicher Qualitätsmerkmale (Pritzker et al. 2006) gestaltet sich aus diesen Gründen nicht einfach. Das Nebeneinander fokaler Schäden und generalisierter Gelenkveränderungen, als Reaktion auf die Zerstörung der Struktur und Funktionalität erschwert die pragmatische Darstellung in Scores, wie auch jüngst von Moskowitz dargestellt wurde (Moskowitz 2006), und relativiert das Gesamtbild der Auswertung dieser Arbeit vor allem bei den PCR-Ergebnissen.

Im Zuge der Standardisierung und Qualitätssicherung wurde 1998 eine Arbeitsgruppe (OARSI) gebildet, die sowohl die klinischen, radiologischen und arthroskopischen Aspekte als auch die Histopathologie (Pritzker et al. 2000+2006) normieren soll, denn das wachsende Interesse, einen universellen Score zur Bewertung der Knorpelqualität zu entwickeln, beinhaltet immer den Verbund mit Klinik, Bildgebung, Arthroskopie und Molekularbiologie. Schwierigkeiten bilden allerdings die zahlreichen Determinanten und ungeklärten Phänomene (Mankin et al. 1971) wie zum Beispiel bei der zu beobachtenden Schmerzsymptomatik und Bildgebung bei Osteoarthritis. Diese Diskrepanzen zeigen sich z.B. auch in der vorliegenden Arbeit bei dem Vergleich der Histologie/ Immunhistologie und der RT-PCR. Deshalb kann niemals von einem molekularbiologischen Befund auf die Histologie geschlossen werden und umgekehrt. Die histologischen und molekularbiologischen Ergebnisse ergeben im Verbund ein vollständigeres Bild über das Potential der Knorpelzellen als die Einzelbetrachtung an sich.

Molekulare Analysen des Knorpelstoffwechsels unter krankhaften Einflüssen sind in großer Anzahl für die Osteoarthritis erfolgt. Die Balance des Matrixaufbaues unter dem Einfluss der Wachstumsfaktoren und des Matrixabbaues ist bei der Osteoarthritis gestört (Aigner und McKenna 2002, Sandell und Aigner 2001, Kuettner 1994). Sowohl anabole als auch katabole Prozesse sind vorerst verstärkt (Sandell und Aigner 2001, Collins und McElligott 1960, Lippiello et al. 1977). TGF- β fördert die Proliferation und die Synthese der Knorpelzellen, verhindert den Wechsel der Chondrozyten in hypertrophe Zellen (von der Mark et al. 1992) und stimuliert die Synthese von extrazellulärer Matrix (Sandell und Aigner 2001). Diese Arbeit stellt heraus, dass sowohl vor der Zellkultur als auch danach relativ hohe Expressionsmengen von TGF- β 1 im Sinne einer anabolen sowie protektiven Reaktion auf die Stimulierung zu finden sind. Allerdings kann eine Überexpression von TGF- β 3 auch eine Fibrose beschreiben (Akeson et al. 2001), so dass die schon bekannten widersprüchlichen Aussagen betreffs der TGF- β -Wirkung näher untersucht werden müssen. Die inhibierende Wirkung von IL-1 als ein Gegenspieler des TGF- β 's auf die Aggrecanexpression (Kuettner 1994) kann in dieser Arbeit jedoch nicht dargestellt werden, denn es ergeben sich Proben, die eine relativ hohe IL-1-Expressionsmenge mit einer relativ hohen Aggrecanexpression aufweisen, aber auch Proben mit geringer IL-1- und geringer Aggrecan-Expression. Die relativ geringfügige Expression von IL-1, einem Schlüsselzytokin der Arthritis, korreliert eher mit einem früheren Stadium der Knorpeldegeneration (Martel-Pelletier et al. 1992) und war auch zu erwarten, da keine osteoarthrotische Knorpelläsionen der Untersuchung zugeführt wurden. Die Wirkungsweise der Zytokine und Wachstumsfaktoren erfolgt nach dem Prinzip der gegenseitigen Beeinflussung (Till 1999). Sie dürfen daher nicht isoliert voneinander betrachtet werden. Allerdings lassen sich in der vorliegenden Arbeit insgesamt keine Wechselbeziehungen zwischen den Wachstumsfaktoren TGF- β , BMP-7, bFGF und VEGF untereinander sowie ein Einfluss auf die extrazelluläre Matrix zeigen. Feine, fokale Expressionsunterschiede von Knorpelzellen oder etwa deren Einfluss auf die Wachstumsfaktoren und die extrazelluläre Matrix können in der vorliegenden Arbeit aufgrund der semiquantitativen Auswertungsmethode nicht dargestellt werden, da numerische Vergleiche der Ein- und Ausgangskontrollen nur sehr bedingt möglich sind. Zudem sind die molekularbiologischen Ergebnisse in der vorliegenden Arbeit schichtunspezifisch. Methoden, eine schichtspezifische, zellbiologische Differenzierung durchzuführen, scheinen mit den derzeitigen Methoden nur schwer möglich zu sein (Darling et al. 2004, Sandell und Aigner 2001), so dass die Ergebnisse der PCR in dieser Arbeit ein Abbild des

gesamten Knorpelstoffwechsels aller Schichten darstellen. Außerdem sei an dieser Stelle darauf zu verwiesen, dass der Expressionsnachweis der mRNA nicht mit der Translation und den posttranslationalen Mechanismen gleichzusetzen ist, die zur Matrixdeposition führen.

Grundsätzlich zeigt sich in der vorliegenden Arbeit eine Desorganisation der Knorpelhomöostase mit dem Nebeneinander von dedifferenzierten und hypertrophen Knorpelzellen. Während die Immunhistologie lediglich das augenblickliche Stoffwechselgeschehen charakterisiert, stellt die PCR nur eine Momentaufnahme der Expression dar und die Histologie auch vergangener Stoffwechselsituationen. Der stattfindende Wechsel der Chondrozyten zu verschiedenen Phänotypen, der entweder zur Dedifferenzierung oder zu hypertrophen Knorpelzellen führt, kann trotz der schichtunspezifischen Auswertung und dem Nachweis der mRNA-Expression in den Analysen dieser Arbeit aufgrund der immunhistologischen Befunde vermutet werden. In der vorliegenden Arbeit befinden sich gesunde, hypertrophe und dedifferenzierte Knorpelzellpopulationen regelmäßig nebeneinander. Die Technik der Auswertungsmodi ermöglicht aber keine genaue Differenzierung, sondern erbringt nur den Nachweis über deren Existenz. Erschwerend kommt hinzu, dass die Befunde vor der Zellkultur nicht mit den in vivo Daten gleichzusetzen sind, denn die enzymatische Trennung der Knorpelzellen aus dem Verbund stimuliert den Metabolismus der Knorpelzellen wahrscheinlich auch in kürzester Zeit, d.h. über Nacht. So finden sich in der vorliegenden Arbeit beispielsweise die Expression von Wachstumsfaktoren und eine veränderte Expression von extrazellulärer Matrix in eigentlich normalem Knorpel.

Hypertrophe Zellen exprimieren u.a. Typ X Kollagen und Alkalische Phosphatase (Sandell und Aigner 2001, Kirsch et al. 1992, Pfander et al. 2001b). Bei der Osteoarthritis wird Typ X Kollagen nicht nur unterhalb der Tidemark nachgewiesen, sondern auch in den tiefen Knorpelschichten (von der Mark et al. 1992). In einigen Proben der vorliegenden Arbeit wird Kollagen Typ X stärker exprimiert und immunhistologisch v.a. in den tiefen Knorpelschichten dargestellt. Unterschiede zwischen der Kollagen Typ X-Expression und der immunhistologischen Detektion konnten in der vorliegenden Arbeit beobachtet werden und sind schon bei Kirsch (Kirsch et al. 1992) auffällig geworden. Allerdings waren in Bezug auf das Vorhandensein von Kollagen Typ X kaum Unterschiede zwischen den beiden Kollektiven OCD und Trauma ersichtlich. So zeigt sich histologisch z.B. in beiden Kollektiven die Formation einer Wachstumsfuge, die bislang als Charakteristikum der OA

angesehen wurde (Pfander et al. 2001b, Aigner und McKenna 2002). Das von hypertrophen Chondrozyten der Wachstumsfuge exprimierte VEGF zeigte in der vorliegenden Arbeit kaum Unterschiede zwischen den Kollektiven der OCD und des Traumas, wie auch für die geringeren Stadien der OA bei Pfander et al. (Pfander, 2001a) nachgewiesen werden konnte.

Des Weiteren ist in dieser Arbeit die von hypertrophen Knorpelzellen gebildete Alkalische Phosphatase beurteilt worden, die ein Differenzierungsmarker der Wachstumsfuge sowie der Arthrose darstellt (Pullig et al. 2001). Hierbei zeigte die Arbeit auf, dass sich in einigen Präparaten deutliche Ausbreitungstendenzen von den tiefen Knorpelschichten manchmal über das gesamte Präparat hinaus zu verzeichnen waren. Die aus den hypertrophen, terminal differenzierten Knorpelzellen resultierende Apoptose wird kontrovers diskutiert (Pfander et al. 2001b, Aigner und McKenna 2002) und auch in der vorliegenden Arbeit nicht näher untersucht. Histologisch gefundene, leere Knorpelhöhlen sind in der vorliegenden Arbeit z.B. durch die Präparation nicht sicher von Artefakten zu unterscheiden. Allerdings ist eine sehr hohe Vitalität von 94% bei der Bestimmung vor der Zellkultur vorzuweisen.

Dedifferenzierte Knorpelzellen exprimieren Kollagen Typ I und keine mRNA von Kollagen Typ II und Aggrecan (Sandell und Aigner 2001, Aigner und McKenna 2002, Pfander et al. 2001b, Benya et al. 1978, von der Mark 1986). In der vorliegenden Arbeit konnten im Einzelnen keine Signifikanzen darin beobachtet werden. Lediglich auf eine Reduktion der Expression von Typ II Kollagen- und Aggrecan- mRNA bei einer leichten Expressionszunahme von Kollagen Typ I- mRNA kann nach der Zellkultur verwiesen werden, die zusätzlich durch die mosaikartigen Expressionsunterschiede maskiert werden. Immunhistologisch zeigt sich Typ I Kollagen vorwiegend in den oberflächlichen Schichten und breitet sich tendenziell in die Tiefe aus. Grundsätzlich wird Kollagen Typ I aber relativ selten nachgewiesen, oftmals aber in fibrösen Auflagerungen und im fibrösen Ersatzgewebe. Innerhalb von gesundem und arthritischem Knorpel findet sich dagegen bei Aigner und McKenna keine Typ I Kollagen- Expression (Aigner und McKenna 2002), was in Einzelfällen einen Unterschied zu der vorliegenden Arbeit darstellt.

Zusammenfassend kann nach Abschluss der durchgeführten Forschungsarbeiten gesagt werden, dass keine signifikanten Unterschiede zwischen OCD und Trauma auffällig geworden sind. Die vorliegende Arbeit fand heraus, dass sich in beiden Kollektiven deutlich mehr Gemeinsamkeiten darstellen lassen, als vor den Experimenten angenommen

wurde. Ein spezifischer Marker für die OCD konnte nicht gefunden werden, so dass vermutet werden muss, dass beiden Kollektiven eine ähnliche, wenn nicht sogar die gleiche Ätiologie zugrunde liegt.

In einer Zwischenbilanz können verschiedene Ursachen für die Heterogenität von an sich schon uneinheitlichem Gelenkknorpel angegeben werden. Zudem sind in der Literatur mannigfaltige Studiendesigns eruierbar, die kaum Vergleiche zu der eigenen Arbeit und v.a. zu den RT-PCR-Daten erlauben (Darling et al. 2004, Mankin et al. 1971, Pritzker et al. 2006). Gründe dafür liegen z.B. darin, dass nur bedingt von einem Tiermodell auf humane Knorpelzellen geschlossen werden kann, dass Knorpelzellen z.B. durch Zugabe von Wachstumsfaktoren stimuliert werden, dass die Auswahl der Primer nach anderen Gesichtspunkten erfolgte oder ein anderer Ausschnitt in der extrem vernetzten Struktur der Wirkungsbeeinflussung untersucht wurde.

Im Gegensatz zu den uneinheitlichen Verarbeitungsmodi werden histologische Auswertungen zumeist mittels der universellen Mankin-Skala durchgeführt, die (Mankin und Lippiello 1970, Mankin et al. 1971) zwar immer öfter modifiziert wurde, aber weiterhin als Grundlage der histologischen Auswertung von Mensch und Tier dient. Auch in dieser Arbeit ist die Mankin-Skala mit immunhistochemischen Daten erweitert worden, weil sie bei der enormen Heterogenität von Knorpel universell und nicht nur bei OA einsetzbar ist. Ferner wurde in dieser Arbeit die Ungleichheit von chondralem und osteochondralem Knorpel berücksichtigt. Auch Bruns (Bruns und Steinhagen 2000) unterscheidet in Abhängigkeit von der Mitbeteiligung des subchondralen Knochens rein chondrale und osteochondrale Defekte, während die ICRS (ICRS, 2005) nur osteochondrale Knorpelstücke bewertet. Dabei stellen aber die chondralen Knorpelstückchen, die in der vorliegenden Arbeit untersucht wurden, den größeren Anteil dar und nicht immer ist auf die aussagekräftigeren, osteochondralen Knorpelstücke zurückzugreifen. Wagner (Wagner 1964) unterteilt die Dissekate des Kniegelenkes in eine malazische und eine dissezierende Form, deren Differenzierung in der vorliegenden Arbeit u.a. wegen der fehlenden Altersselektion nicht möglich ist. Eine Ursache für diese beiden Verlaufsformen gibt Wagner jedoch nicht an. Dennoch können, im Hinblick in der hier vorliegenden Arbeit Abweichungen in der Art der chondralen und osteochondralen Knorpelstückchen liegen, die bisher nicht differenziert werden konnten.

Die Bildung freier Gelenkkörper ist weiterhin nicht spezifisch für die OCD, sondern auch typisch für den Grad 4 der OA (Pritzker et al. 2006, ICRS 2005). Allein die Tatsache, dass

ein freier, chondraler Gelenkkörper ohne äußeres und erinnerliches Trauma eventuell bei einem jungen Menschen vorliegt, beweist demzufolge nicht die OCD. Sicherlich sind zur Beurteilung auch das umgebende Knorpelgewebe und eventuell multifokale Degenerationen von Bedeutung. Bruns (Bruns und Steinhagen 2000) verweist aus diesem Grunde, abgesehen von den Begleitreaktionen einer Arthrose, auf die erschwerte Abgrenzung akut traumatisch, reversibler und manifester, arthritischer Veränderungen. Genau diese Aspekte lassen eine äquivalente Pathogenese von Dissekation bei der OCD und Osteoarthrose des Stadiums 4 vermuten. Vielleicht muss aber auch die Definition des OCD- Begriffes viel enger gefasst werden wozu weitere Studien erforderlich sind, die die Ätiologie der OCD restlos klären.

Wie bereits erwähnt findet sich für die OCD wenig vergleichbare Literatur. In einer Untersuchung von Semevolos (Semevolos et al. 2000) wird in einem Tiermodell die Osteochondrose des Pferdes molekularbiologisch und histologisch untersucht und mit gesundem und äquivalentem Gelenkknorpel von Pferden verglichen.

Die TGF- β - und Kollagen Typ I- Expression waren in der Arbeit von Semevolos als Antwort auf die Reparatur geschädigten und dedifferenzierten Knorpels geringfügig stärker als in der gesunden Kontrollgruppe nachzuweisen. Auf die Problematik der Übertragung solcher Ergebnisse auf den Menschen wurde bereits verwiesen. Viel deutlicher zeigt sich dagegen die Expression von TGF- β und Kollagen Typ I in der vorliegenden Arbeit. Der fehlende Unterschied zu den Ergebnissen von Semevolos ist wahrscheinlich in seinem Vergleich mit einer gesunden Kontrollgruppe begründet, der in den vorliegenden Ausführungen zwischen der OCD und dem Trauma, d.h. dem potentiell arthritisch veränderten Knorpel, stattfindet.

Die gesunden Kontrollgruppen in der vorliegenden Arbeit, d.h. die Notchzellen beider Kollektive können nicht als Referenzgruppe gelten, da erstens nicht genau bekannt ist, welches Expressions- und Stoffwechselprofil gesunde Knorpelzellen aufweisen, zweitens in dieser Arbeit davon ausgegangen wird dass die Notchzellen in vivo, insbesondere die des OCD- Kollektives, nicht unstimuliert sind und drittens das Problem der Stimulation durch die Knorpelzellisolation besteht, die die in vivo- Unterschiede maskieren würde. Letzteres Problem würde allerdings alle molekularbiologischen Analysen in der Literatur betreffen. Dass die OCD- Notchzellen zumindest andersartig stimulierbar sind, resultiert aus der Vermutung, dass die OCD eine unterschiedliche Ätiologie gegenüber dem Trauma besitzt und mit einer generalisierten Veränderung des Knorpelmetabolismus einhergehen

müsste. Diese Vermutung lässt sich aufgrund der genannten Störfaktoren in der vorliegenden Arbeit nicht beweisen.

Für die Expression der knorpelspezifischen Matrixbestandteile Aggrecan und Kollagen Typ II zeigt Semevolos keine Unterschiede zwischen beiden Gruppen auf. Aggrecan wird in geringerem Maße als Kollagen Typ II exprimiert. Diese Aussagen stimmen mit den Befunden dieser Arbeit überein. Semevolos beobachtet ebenfalls keine Unterschiede in Bezug auf die Hypertrophie von Knorpelzellen, obwohl er eine gesunde Kontrollgruppe heranzieht. Bei den Untersuchungen der vorliegenden Arbeit verhält sich dagegen Typ X Kollagen unterschiedlich. Die Expression ist relativ deutlich in Dissekat, Defekt und Flake. Überraschenderweise zeigt sich auch in der OCD- Notch eine relativ deutliche Expression von Typ X Kollagen, während in der Trauma- Notch eine minimale bis fehlende Expression nachzuweisen ist. Vermutlich besteht ein Zusammenhang im Hinblick auf die Stimulation der Expression von Typ X Kollagen, das sich vor allem in den Kontrollen nach der Zellkultur manifestiert und in allen Proben relativ einheitlich zur Darstellung gelangt. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit ergeben zwischen dem OCD- Kollektiv und dem Trauma Kollektiv kaum Unterschiede, so dass die von Semevolos für das Tiermodell herausgestellten Spezifika bei der OCD des Menschen nicht oder nur bedingt gelten. In einer Arbeit von Rehbein wurde 1950 (Rehbein 1950) der Versuch unternommen, eine OCD experimentell hervorzurufen, die histologisch untersucht wird. Mittels verschieden starker, repetitiver Erschütterungen auf eine bestimmte Lokalisation eines eingespannten Hundebeines wurden histologische Veränderungen des subchondralen Knochens und des Knochenmarkes beschrieben. Die Erschütterungen führten zu einer Abgrenzungszone, die toten und lebendigen Knochen voneinander trennen und im belastungsfreien Intervall zum Anbau neuen Knochens führte, was letztendlich zu einem gelenkwärts gerichteten Regenerationsprozess führte sofern keine weitere Traumatisierung stattfand. In fort-führenden Versuchen mit diesen traumatisierten Gelenken konnte eine Unterbrechung dieses Regenerationsprozesses nachgewiesen werden, der zu einem aseptischen Sequester ohne Reparaturkapazität führte und unter bestimmten Bedingungen zu einer Loslösungszone führte. Veränderungen des Knorpels werden in diesem Artikel allerdings nur beiläufig erwähnt. Aufgrund der einwirkenden Kräfte zeigte sich der dem Impulsgeber direkt anliegende Knorpel mit einem Verlust an Basophilie. Die Kernfärbung sei, so sagt Semevolos, in allen vier Schichten des Knorpels und vor allem in der Intermediär- und Tangentialfaserschicht deutlich reduziert. Nekrotischer Knorpel und leere Zellhöhlen fanden sich in allen Knorpelschichten, was sich als Unterschied zu den Betrachtungen der

vorliegenden Arbeit darstellt, denn die Vitalität der Knorpel-exemplare ist mit 94% unbestritten. Letzteres Ergebnis steht ebenfalls im Kontrast zu den Ergebnissen von Kuroki (Kuroki et al. 2001), bei dem sich weniger lebensfähige Zellen in den OCD- Läsionen zeigten. Die Erörterung der Artefakte im histologischen Bild wurde schon angestellt. Rehbein stellt aber Gegensätze in der histologischen Evaluierung des Knorpels und der Gelenkkörper heraus, die besonders groß wären, wenn sich das Dissekat noch in situ befinden würde. Die Analysen der vorliegenden Arbeit haben diese Tatsache gestützt und können sogar auf die Gesamtheit der untersuchten histologischen Präparate ausgeweitet werden.

Die bei Semevolos, Kuroki und Rehbein beschriebenen Veränderungen sind nicht unbedingt typisch für die OCD, da in den Analysen der hier vorliegenden Arbeit diese Veränderungen in beiden Kollektiven, d.h. nicht nur bei der OCD, sondern auch bei den traumatisch gelösten Knorpelfragmenten zu finden sind. Sie sind deshalb unspezifischer Art und erlauben keine Unterscheidung der Pathomechanismen von OCD, Trauma und Früharthrose. Unterschiede sind wahrscheinlich begründet in der Heterogenität des Knorpels und seines variablen Regenerationsvermögens. Die Ähnlichkeiten in den Expressionsprofilen können keine Trennung der beiden Kollektive OCD und Trauma erkennen lassen. Dies könnte Ursache der fehlenden Selektion meiner Untersuchungen sein oder aber einen Zusammenhang zwischen der OCD und der Osteoarthritis darstellen. Die zur Osteoarthritis führenden Begleitreaktionen von Synovia, Knochen, Bändern, der Kapsel und der Muskeln (Bruns und Steinhagen 2000, Buckwalter und Mankin 1997), die definitionsgemäß zur Osteoarthritis (WHO) gehören, sind bei der OCD allerdings bisher nicht beschrieben. Aufgrund des akuten und massiven Ablaufs der Loslösung des Dissekates bei der OCD sind die entzündlichen Prozesse und Begleitreaktionen vermutlich noch nicht so deutlich ausgeprägt. Demzufolge könnte die OCD eine akute und fokale Reaktion auf Störungen unbekannter, wahrscheinlich traumatischer und multifaktorieller Art mit zunächst umschriebenem Knorpelschaden sein, der Zeichen der OA in sich trägt und die Progression in OA fördert, während die OA an sich eine chronische Erkrankung und Reaktion auf dauerhafte Schädigungen darstellt.

Während der Zellkultur sind die isolierten Knorpelzellen der Kollektive Trauma und OCD in der Lage zu proliferieren und danach sowohl typische als auch untypische Kollagene

und Wachstumsfaktoren zu exprimieren. Knorpelzellen proliferieren in Kultur, sie dedifferenzieren, sie verlieren ihren Phänotyp und können in dreidimensionalen Matrices redifferenzieren (Tallheden et al. 2005, Sandell und Aigner 2001, O' Driscoll et al. 2001). Das Potential von bisher gesunden Knorpelzellen der Notchregion wird bei der ACT ausgenutzt. Die Erkenntnis besteht darin, dass sich in der vorliegenden Arbeit sich auch bei den übrigen Kollektiven ein entsprechendes Potential von Knorpelzellen zeigt, welches die Nutzung dieser Zellen für die ACT erlauben könnte. Allerdings beschreibt auch Tallheden (Tallheden et al. 2005) die noch nicht ausgereifte Therapieoption, indem er schwer osteoarthrotische Knorpelzellen auf ihr Vermögen zur Regeneration unter Zellkulturbedingungen hin erforscht.

Es muss davon ausgegangen werden, dass es in der zugrunde liegenden Arbeit zwar einige Unterschiede in der Stimulierbarkeit der Knorpelzellen unter Zellkulturbedingungen gibt, aber im Allgemeinen ein Trend der Homogenisierung aufzuzeigen ist, der sich scheinbar in beiden Kollektiven manifestiert. Ferner besteht noch keine lückenlose Klarheit darüber, inwiefern die Proliferation und Differenzierung durch Wachstumsfaktoren gezielt gesteuert und beeinflusst werden können. Überdies ist noch nicht genau untersucht, welche Stimuli der bradytrophe Knorpel erhalten muss, damit sich genotypische oder phänotypische Veränderungen ergeben und wie reversible und manifeste Veränderungen unterschieden werden können.

9. Schlussfolgerungen

Als zentrales Ergebnis der Untersuchungen dieser Arbeit ist zu hervorzuheben, dass die erwarteten Unterschiede zwischen osteochondrotischen und traumatischen Läsionen nicht nachgewiesen werden konnten. Folglich muss davon ausgegangen werden, dass beiden Läsionen ein gemeinsamer Pathomechanismus zugrunde liegen könnte. Es zeigt sich eine enorme Variationsbreite der Morphologie von Gelenkknorpel. Die Desorganisation der Knorpelhomöostase zeigt sich in einem Nebeneinander von Dedifferenzierung, Hypertrophie und normalem Knorpel. Die hohe Vitalität und Qualität der extrahierten Zellen wiesen auf eine enorme, intrinsische Reparaturkapazität, die es gilt weiter zu erforschen, damit diese Mechanismen besser verstanden werden und Verfahren zur Knorpelreparatur entwickelt werden können, die den hohen Anforderungen von Gelenkknorpel entsprechen. Gegenstand zukünftiger Untersuchungen sollte sein, das Bild der OCD und OA sowie prognostische Marker auf molekularer Ebene zu erklären, um Therapiemöglichkeiten wie die ACT und die Gentherapie zu optimieren.

10. Literaturverzeichnis

- Aglietti P, Ciardullo A, Giron Fund Ponteggia F. 2001. Results of arthroscopic excision of the fragment in the treatment of osteochondritis dissecans of the knee. *Arthroscopy*, 17: 741–746.
- Aigner T und McKenna L. 2002. Molecular pathology an pathobiology of ostoarthritic cartilage. *CMLS, Cell Mol Life Sci*, 59:5-18.
- Akeson W, Bugbee W, Chu C und Giurea A. 2001. Normal Cartilage Repair: Differences in Mesenchymal Tissue Repair. *Clinical Orthopaedics and Related Research*, 391S: S124-S141.
- Alexander A und Lichtmann DM. 1980. Surgical treatment of transchondral talar- dome fractures (osteochondritis dissecans). *J Bone Joint Surg*, 62-A:646- 652.
- Anderson A und Pagnani MJ. 1997. Osteochondritis dissescans of the femoral condyles. Long- term results of excision of the fragment. *Am J Sports Med*, 25:830–834.
- Arcq M. 1974. Behandlung der Osteochondrosis dissecans durch Knochenspanbolzung. *Arch Orthop Unfall Chir*, 79:297-312.
- Aspenberg P und Forslund C. 2000. Bone morphogenetic proteins and tendon repair. *Scan J Med Sci Sports*, 10:372-375.
- Aurich M, Poole AR, Reiner A, Mollenhauer Ch, Margulis A, Kuettner KE, Cole AA. 2002. Matrix Homeostasis in Aging Normal Human Ankle Cartilage. *Arthritis Rheum*, 46 (11):2903-2910.
- Aurich M, Squires GR, Reiner A, Mollenhauer JA, Kuettner KE, Poole AR und Cole AA. 2005. Differential matrix degradation and turnoer in early cartilage lesions of human knee and ankle joints. *Arthritis Rheum*, 52 (1):112-119.
- Ausubel F, et al eds. 1990. *Current Protocols in Molecular Biology*. New York: Green Publishing Assoc. and Wiley Interscience.
- Ausubel FM. 1992. *Short Protocols in Molecular Biology* 2nd Edition. New York.
- Axhausen G. 1954. Die Ernährungsunterbrechung am Knochen. *Ergebn allg Path Anat*, 37: 207.
- Bacic M, Edwards NA und Merrill MJ. 1995. Differential expression of vascular endothelial growth factor (vascular permeability factors) forms in rat tissues- Short communication. *Growth Factors*, 12:11-15
- Barsh G und Byers HS. 1981. Reduced secretion of structurally abnormal type I procollagen in a form of osteogenesis imperfecta. *Proc NatlAcadSci USA*, 78 (8):5141-5146.
- Benya P, Padilla SR und Nimni ME. 1978. Independent regulation of collagen types by chondrocytes during the loss of differentiated function in culture. *Cell*, 15:1313-1321.

- Benya P und Schaffer JD. 1982. Dedifferentiated chondrocytes reexpress the differentiated collagen phenotype when cultured in agarose gels. *Cell*, 30:215- 224.
- Böttner M, Krieglstein K und Unsicker K. 2000. The Transforming Growth Factor- β : Structure, Signaling, and Roles in Nervous System Development and Functions. *J Neurochem*, 75:2227- 2240.
- Bracete A, Fox DK und Simms D. 1998. Isolation and Long- Term Storage of RNA from Ribonuclease- Rich Pancreas Tissue. *FocusR*, 3 (20):82-83.
- Brittberg M, Lindahl A, Nilsson A, Ohlsson C, Isaksson O und Peterson L. 1994. Treatment of deep cartilage defects in the knee with autologous chondrocyte transplantation. *N Engl J Med*, 331:889–895.
- Broadley K, Aquino AM, Woodward SC, Buckley- Sturrock A, Sato Z, Rifkin DB und Davidson JM. 1989. Monospecific antibodies implicate basic fibroblast growth factor in normal wound healing. *Laboratory Investigation*, 61 (5):571-575.
- Bruns J und Rosenbach B. 1992. Osteochondrosis dissecans of the talus. Comparison of results of surgical treatment in adolescents and adults. *Arch Orthop Trauma Surg*, 12:23–27.
- Bruns J. 1996. Osteochondrosis dissecans Pathogenese, Diagnose und Therapie. Stuttgart: Ferdinand Enke Verlag.
- Bruns J und Steinhagen J. 2000. Der Knorpelschaden als präarthrotische Deformität- Biologische Grundlagen. *Deutsche Zeitschrift für Sportmedizin*, 51 (2):42-47.
- Buckwalter J und Mankin HJ. 1997. Articular cartilage. part II: Degeneration, and osteoarthritis, repair, regeneration and transplantation. *J Bone Joint Surg*, 79-A:612-632.
- Burkart A und Imhoff AB. 2000. Bildgebung nach autologer Chondrozytentransplantation. Korrelation kernspintomographischer, histologischer und arthroskopischer Befunde. *Orthopäde* 29:135–144.
- Cahill B. 1995. Osteochondritis dissecans of the knee: Treatment of juvenile and adult forms. *J Am Acad Orthop Surg*, 3:237-257.
- Chomczynski P, Sacchi, N. 1987. *Anal Biochem*, 162:156.
- Chomczynski P und Sacchi N. 1993. A reagent for the single- step simultaneous isolation of RNA, DNA and proteins from cell and tissue samples. *Biotechniques*, 15 (3):532-537.
- Chubinskaya S und Kuettner KE. 2003. Regulation of osteogenic proteins by chondrocytes. *Int J Biochem Cell Biol*, 35 (9):1323- 1340.
- Collins D. 1939. The pathology of osteoarthritis. *Br J Rheumatol*, 1: 248- 2462.
- Collins D und McElligott TF. 1960. Sulphate (35SO_4) uptake by chondrocytes in relation to histological changes in osteoarthritic human articular cartilage. *Ann Rheum Dis*, 19:318-330.
- Darling E, Hu JCY und Athanasiou KA. 2004. Zonal and topographical differences in articular cartilage gene expression. *J of Orthopaedic Research*, 22:1182-1187.

- de Wet W, Pihlajaniemi T, Myers J, Kelly TE und Prockop DJ. 1983. Synthesis of a shortened pro- $\alpha 2$ (I) chain and decreased synthesis of pro- $\alpha 2$ (I) chains in a proband with osteogenesis imperfecta. *JBiolChem*, 258:7721-7728.
- Dell'Accio F, Vanlauwe J, Bellemans J, Neys J, De Barri C und Luyten FP. 2003. Expanded phenotypically stable chondrocytes persist in the repair tissue and contribute to cartilage matrix formation and structural integration in a goat model of autologous chondrocyte implantation. *J Orthop Res*, 21:123-131.
- DGU/DGOOC: Behrens B, Bruns J, Erggelet C, Esenwein S, Gaissmaier C, Gekle C, Krackhardt T, Marlovits S, Mollenhauer J, Niethard FU, Perka C, Ruhnau K, Schneider U, Steinwachs M und Weise K. 2002. Stellungnahme der Arbeitsgemeinschaft- Autologe Chondrozyten- Transplantation (ACT) und Tissue Engineering- unter Schirmherrschaft der DGU und DGOOC. *Z Orthop*, 140:132-137.
- Dipaola J, Nelson DW und Colville MR. 1991. Characterizing osteochondral lesions by magnetic resonance imaging. *Arthroscopy*, (7):101-104.
- Ducy P und Karsenty G. 2000. The family of bone morphogenetic proteins. *Kidney International*, 57:2207-2214.
- Duncan S und Watt AJ. 2001. BMPs on the road to hepatogenesis. *Genes Dev* 15:1879-1884.
- Erggelet C, Browne JE, Fu F, Mandelbaum BR, Micheli LJ und Mosely JB. 2000. Die autologe Chondrozyten- Transplantation zur Behandlung von Knorpeldefekten des Kniegelenkes. *Zentralbl Chir*, 125:516-522.
- Ferrara N. 1999. Molecular and biological properties of vascular endothelial growth factor. *J Mol Med* 77:527-543.
- Ferrara N und Gerber HP. 2001. The role of vascular endothelial growth factor in angiogenesis. *Acta Haematologica*, 106:148-156.(3):84-85.
- Gaissmaier C, Fritz J und Müller JE. 1998. Autologe Knorpelzelltransplantation – Indikation und Technik. *Akt Traumatol*, 28:245-250.
- Gaissmaier C, Fritz J, Mollenhauer J, Schneider U, Marlovits S, Anders J, Schewe B und Weise K. 2003. Verlauf klinisch symptomatischer Knorpelschäden des Kniegelenks: Ergebnisse ohne und mit biologischer Rekonstruktion. *Deutsches Ärzteblatt*, 38:A-2448.
- Gerber H, Vu TH, Ryan AM, Kowalski J, Werb Z und Ferrara N. 1999. VEGF couples hypertrophic cartilage remodeling, ossification and angiogenesis during endochondral bone formation. *Nat Med*, 5:623-628.
- Giannini S, Vannini F und Buda R. 2002. Osteoarticular grafts in the treatment of OCD of the talus: mosaicplasty versus autologous chondrocyte transplantation. *Foot Ankle Clin*, 7:621-633.
- Green W und Banks HH. 1953. Osteochondritis dissecans in children. *J Bone Joint Surg*, 35-A:26-47.

- Grönweller E. 2003. Die Magnetresonanztherapie als Instrument zur Verlaufskontrolle nach Knorpelreparatur. Springer- Verlag.
- Guthrie S, Plummer JM und Vaughan LC. 1992. Aetiopathogenesis of canine elbow osteochondrosis: a study of loose fragments removed at arthrotomy. Research in Veterinary Science, 52:284-291.
- Hefti F, Beguiristain J und Krauspe R. 1999. Osteochondritis dissecans: a multicenter study of the European Pediatric Orthopedic Society. J Pediatr Orthop B, 8:231–245.
- Horwitz J, Chua J, Noel M, Donati JT und Friesler J. 1996. Substrates for cytochemical demonstration of enzyme activity. II Some dihalo-3-indolyl phosphates and sulfates. JMedChem, 9:447.
- ICRS 2005. (International Cartilage Repair Society) Cartilage Injury Evaluation Package, www.cartilage.org.
- Jackson J, Minton JAL, Ho ML, Wei N und Winkler JD. 1997. Expression of vascular endothelial growth factor in synovial fibroblasts is induced by hypoxia and interleukin 1 β . J Rheumatol, 24:1253-1259.
- Junqueira L und Carneiro J. 1996. Histologie. Berlin Heidelberg: Springer- Verlag.
- Kaab M, Ito K, Clark JM und Notzli HP. 1998. Deformation of articular cartilage collagen structure under static and cyclic loading. J of Orthopaedic Research, 16:743-751.
- Karstentý G, Ravazzolo R und Cromburghe B. 1991. Purification and functional characterization of a DNA binding protein that interacts with a negative element in the mouse Alpha 1 (I) collagen promoter. J Biol Chem, 266:24842-24848.
- Kirsch T, Swoboda B. und von der Mark K. 1992. Ascorbate independent differentiation of human chondrocytes in vitro: simultaneous expression of type I and X collagens and matrix mineralization. Differentiation, 52:89-100.
- Kivrikko K. 1993. Collagens and their abnormalities in a wide spectrum of diseases. AnnMed, 25:113-126.
- Knöpfel S. 2002. Blickpunkt Hyaluronsäure. Noack W. Hrsg. Stuttgart: Aesopus Verlag
- Krieg T, Perlish JS, Mauch C und Fleischmeier R. 1985. Collagen synthesis by scleroderma fibroblast Ann N Y Acad Sci, 460:375-386.
- Kriegstein K, Henheik P, Farkas L, Jaszai J, Galter D, Krohn K und Unsicker K. 1988. GDNF requires TGF- β for establishing its neurotrophic activity. J Neurosci, 18:9822-9834.
- Kuettner K und Bendicht U Pauli. 1983. Cartilage: Structur, Function, and Biochemistry. Kapitel 10: Vascularity of Cartilage. New York: Academic Press.
- Kuettner K. 1994. Osteoarthritis: Cartilage Integrity and Homeostasis. St Louis, Baltimore Boston, Chicago, London, Philadelphia, Sydney, Toronto: Mosby.
- Kuettner K und Cole AA. 2005. Cartilage degeneration in different human joints. Osteoarthritis Cartilage, 13 (2):93- 103.

- Kumagai J, Kiriti S, Uthoff HK, Okawa Y und Ooshima A. 1994. Immunohistochemical distribution of type I, II and III collagens in the rabbit supraspinatus tendon insertion. *JANAT*, 185:278-284.
- Kuroki K, Cook JL, Tomlinson JL und Kreeger JM. 2001. In vitro characterisation of chondrocytes isolated from naturally occurring osteochondrosis lesions of the humeral head of dog. *Am J Ve Res*, 63 (2):186-193.
- Laurent G. 1985. Biochemical pathways leading to collagen deposition in pulmonary fibrosis. *Ciba Found Symp*, 114:222-233.
- Li J, Williams JM, Zhong Z, Kuettner KE, Aurich M, Mollenhauer J und Muehlmann C. 2005. Reliability of diffraction enhanced imaging for assessment of cartilage lesions, ex vivo. *Osteoarthritis and Cartilage*, 13 (3):187-197.
- Linden B. 1977. Osteochondritis dissecans of the femoral condyles. A long term follow-up study *J Bone Joint Surg*, 59-A:769-776.
- Lippiello L, Hall D und Mankin HJ. 1977. Collagen Synthesis in Normal and Osteoarthritis Human Cartilage. *The Journal of Clinical Investigation*, 59:593-600.
- Löffler G und Petrides PE. 1998. *Biochemie und Pathobiochemie*. Aufl. Berlin Heidelberg: Springer.
- Lougin A, Souchier C, Ffrench M und Bryon PA. 1993. Comparison of Anti- fading Agents Used in Fluorescence Microscopy: Image Analysis and Laser Cofocal microscopy Study.
- Mankin H und Lippiello L. 1970. Biochemical and metabolic abnormalities in articular cartilage from osteo- arthritic human hips. *J Bone Joint Surg*, 52A:424-434.
- Mankin H, Dorfmann H, Lippiello L und Zarins A. 1971. Biochemical and metabolic abnormalities in articular cartilage from osteoarthritic human hips. II. Correlation of morphology with biochemical and metabolic data. *J Bone and Joint Surg*, 53A (3):523-537.
- Marlovits S, Kutscha- Lissberg F, Aldrian S, Resinger C, Singer P, Zeller P und Vescei V. 2004. Autologous chondrocyte transplantation for the treatment of articular cartilage defects in the knee joint, Techniques and results. *Radiologe*, 44 (8):763-772.
- Maroudas A. 1976. Balance between swelling pressure and collagen tension in normal and degenerate cartilage. *Nature*, 260:808-809.
- Martel- Pelletier J, McCollum R, Di Battista J, Faure MP, Chin JA, Fournier S, Sarfati M und Pelletier JP. 1992. The interleucin-1 receptor in normal and osteoarthritic human articular chondrocytes. Identification as the type I receptor and analysis of binding kinetics and biologic function. *Arthritis Rheum*, 35 (5):530-540.
- Martin GR. 1998. The roles of FGFs in the early development of vertebrate limbs. *Genes Dev* 12:1571-1586.

- Martin I, Vunjak- Novakovic G, Yang J, Langner R und Freed LE. 1999. Mammalian chondrocytes expanded in the presence of fibroblast growth factor 2 maintain the ability to differentiate and regenerate three- dimensional cartilaginous tissue. *Exp Cell Res*, 15:681- 688.
- Martinek V. 2003. Anatomie und Pathophysiologie des hyalinen Knorpels. *Deutsche Zeitschrift für Sportmedizin*, 54 (6):166-170.
- Martinez S. 1997 a. Congenital conditions that lead to osteoarthritis in the dog. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice* 27 (4):735-758.
- Martinez S und Coronado GS. 1997 b. Acquired conditions that lead to osteoarthritis in the dog. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice*, 27 (4):759-775.
- Mayne R und Burgeson RE. 1987. *Structure and Function of Collagen Types*. Orlando: Academic Press
- Michal G, Möllering H und Siedel J. 1983. *Fundamentals (3ed)* VCH Publishers, Verlag Chemie.
- Minas T, Brittberg M, Nillson A, Jansan E, Lindahl A und Peterson L. 2000. Two to Nine Year Outcomes After Autologous Chondrocyte Transplantation of the Knee. *Clin Orth Rel Res*, 374:212- 234.
- Mollenhauer J und Kuettner KE. 1997. Articular Cartilage. In: Dee R. Hrsg. *Principles of orthopaedic practice*. second edition. New York: McGrawHill, 85-98
- Mollenhauer J, Aurich M, Zhong Z, Muehlmann C, Cole AA, Hasnah M, Oltulu O, Kuettner KE, Margulis A, Chapman CD. March 2002. Diffraction- enhanced X- ray imaging of articular cartilage. *Osteoarthritis and Cartilage/ Oars, Osteoarthritis Research Society*, 10(3):163-171
- Mollenhauer J und Aurich M. 2003. Grundlegendes zum Gelenkknorpel. In: Fritz J, Aicher WK und Eichhorn HJ. Hrsg. *Praxisleitfaden der Knorpelreparatur*. Berlin, Heidelberg, New York: Springer- Verlag
- Moore K und Persaud TVN. 1996. *Knochen- und Gelenkentwicklung*. Stuttgart, New York: Schattauer.
- Moskowitz R. 2006. Editorial: Osteoarthritis cartilage histopathology: grading and staging. *Osteoarthritis and Cartilage*, 14:1-2.
- Nagura S. 1960. The so-called osteochondritis dissecans of König. *Clin Orthop*, 18:100-121.
- Nakajima F, Goto K, Morizy H, Ninomiya Y, Einhorn T und Yamazaki M . 2001. Spatial basic fibroblast growth factor. *J Orth Res*, 19:935-944.
- Nakayama T, Cui Y und Christian JL. 2000. Regulation of BMP/Dpp signaling during embryonic development. *CMLS*, 57:943-956.
- Neufeld G, Tessler S, Gitay- Goren H, Cohen T und Levi BZ. 1994. Vascular endothelial growth factor and its receptors. *Prog Growth Factor Res*, 5:89- 97.

- Neufeld G, Cohen T und Greengrinvitch S. 1999. Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors. *FASEB J*, 13:9-22.
- Nishida Y, Knudson CB, Kuettner KE und Knudson W. 2000. Osteogenic protein-1 promotes the synthesis and retention of extracellular matrix within bovine cartilage and chondrocytes cultures. *Osteoarthritis Cart*, 8:127-136.
- Noll S und Schaub- Kuhnen S. 2000. *Praxis der Immunhistochemie*. München, Jena: Urban und Fischer.
- O' Driscoll S, Marx RG, Beaton DE, Miura Y, Galloway SH und Fitzsimmons JS. 2001. Validation of a simple histological, histochemical cartilage scoring system. *Tissue Eng*, 7:313-320.
- Outerbridge R. 1983. Osteochondritis dissecans of the posterior femoral condyle. *Clin Orthop*, 175:121-129.
- Petersen J, Ruecker A, von Stechow D, Adamietz P, Poertner R, Rueger JM und Meenen NM. 2003. Present and Future Therapies of Articular Cartilage Defects. *Eur J Trauma*, 29:1-10.
- Peterson L, Minas T, Brittberg M, Nilsson A, Sjogren- Jansson E und Lindahl A. 2000. Two- to 9-year outcome after autologous chondrocyte transplantation of the knee. *Clin Orthop*, 374:212-234.
- Peterson L. 2002. Articular cartilage transplantation 13 years experience. *J Bone Joint Surg Br*, 84:242.
- Pfander D, Körtje D, Zimmermann R, Weseloh G, Kirsch T, Gesslein M, Cramer T, und Swoboda B. 2001a. Vascular endothelial growth factor in articular cartilage of healthy and osteoarthritic human knee joints. *Ann Rheum Dis*, 60:1070-1073.
- Pfander D, Swoboda B und Kirsch T. 2001b. Expression of Early and Late Differentiation Markers (Proliferating Cell Nuclear Antigen, Syndecan-3, Annexin VI, and Alkaline Phosphatase) by Human Osteoarthritic Chondrocytes. *Am J Pathol*, 159 (5):1777-1783.
- Poltorak Z, Cohen T und Neufeld G. 2000. The VEGF Splice Variants: Properties, Receptors, and Usage for the Treatment of Ischemic Diseases. *Herz*, 25 (2):126-129.
- Poole A. 1986. Proteoglycans in health and disease: structure and functions. *Biochem J*, 236:1-14.
- Priedie K. 1959. A method of resurfacing osteoarthritic knee joints. *J Bone Joint Surg Br*, 41:618-619.
- Pritzker K, Ostergaard K und Salter DM. 2000. Towards standardization of osteoarthritis histopathologie: terminology. topology and technology. *Osteoarthritis and Cartilage*, 8(SupplB):IP010.
- Pritzker K, Gay S, Jimenez SA, Ostergaard K, Pelletier JP, Revell PA, Salter D und van den Berg WB. 2006. Osteoarthritis cartilage histopathology: grading and staging. *Osteoarthritis and Cartilage*, 14:13-29.

- Pufe T, Petersen W, Tillmann B und Mentlein R. 2001. The angiogenetic peptide vascular endothelial growth factor is expressed in foetal an ruptured tendons. *Virchows Arch*, 439:579-585.
- Puhl W. 1974. Die Osteochondritis dissecans des Kniegelenkes als Präarthrose. *Z Orthop*, 112:634-637.
- Pullig O, Pfander D und Swoboda B. 2001. Molekulare Grundlagen der Arthroseinduktion und -progression. *Orthopäde*, 30:825-833.
- Reddi A. 1992. Regulation of cartilage and bone differentiation by bone morphogenetic proteins. *Curr Opin Cell Biol*, 4:850-855.
- Rehbein F. 1950. Die Entstehung der Osteochondrosis dissecans. *Langenbecks Arch u Dtsch Z Chir*, 265:69-114.
- Ribbing S. 1955. The hereditary multiple epiphyseal disturbance and its consequences for the aetogenesis of local malacias- particularly the osteochondrosis dissecans. *Acta Orthop Scandinavica*, (24):286-299.
- Riley E, Lane J, Urist M, Lyons K und Liebermann J . 1996. Bone Morphogenetic Protein-2: Biology and Application. *Clin Orth*, 324:39-46.
- Roberts S, Hollander AP, Caterson B, Menage J und Richardson JB. 2001. Matrix turnover in human cartilage repair tissue in autologous chondrocyte implantation. *Arthritis Rheum*, 44:2586–2598.
- Roberts S, McCall IW, Darby AJ, Menage J, Evans H, Harrison PE und Richardson JB. 2003. Autologous chondrocyte implantation for cartilage repair: monitoring its success by magnetic resonance imaging and histology. *Arthritis Res Ther*, 5 (1):R60-73.
- Romeis B. 1989. *Mikroskopische Technik*. München, Wien, Baltimore: Urban und Schwarzenberger.
- Rosenberg L. 1971. Chemical Basis for the Histological Use of Safranin- O in the Study of Articular Cartilage. *J of Bone and Joint Surg*, 53-A (1):569-582.
- Ryan M und Sandell LJ. 1991. *JBiolChem*, 265 (8):10334-10339.
- Sales de Gauzy J, Mansat C, Darodes PH und Cahuzac JP. 1999. Natural course of osteochondritis dissecans in children. *J Pediatr Orthop B*, 8:26–18.
- Sandell L, Morris N, Robbins JR und Goldring MB. 1991. Alternatively spliced typ II-procollagen mRNAs define distinct populations of cells during vertebral development differential expression of the amino- propeptide. *JCellBiol*, 114:1307-1319.
- Sandell L und Aigner T. 2001. Articular cartilage and changes in arthritis, An introduction: Cell biology of osteoarthritis. *Arthritis Res*, 3:107-113.
- Schenck J, Robert C, Goodnight MD und Jon Marc MD. 1996. Current Concept Review- Osteochondrosis Dissecans. *J Bone Joint Surg [Am]* 1996- 1998, 78-A (3):439-456.

- Schultz A, Lavie L und Hochberg I. 1999. Interindividual heterogeneity in the hypoxic regulation of VEGF- Significans for the development of the coronary artery collateral circulation. *Circulation*, 100:547-552.
- Semevolos SA, Nixon AJ und Brower- Toland BD. 2001. Changes in molecular expression of aggrecan and collagen types I, II, and X, insulin-like growth factor-I, and transforming growth factor- β 1 in articular cartilage obtained from horses with naturally acquired osteochondrosis. *Am J Vet Res*, 62 (7):1088-1094.
- Senger D, Galli SJ, Dvorak AM, Perruzzi CA, Harvey VS und Dvorak HF. 1983. Tumor cells secrete a vascular permeability factor that promotes accumulation of ascites fluid. *Science*, 219:983-985.
- Serra R, Johnson M, Filvaroff EH, LaBorde J, Sheehan DM, Derynk R und Moses HL. 1997. Expression of a Truncated, Kinase- Defective TGF- β Typ II Receptor in Mouse Skletal Tissue Promotes Terminal Chondrocyte Differentiation and Osteoarthritis. *The Journal of Cell Biology*, 139:541-552.
- Shida J, Jingushi S, Izumi T, Ikenoue T und Iwamoto Y. 2001. Basic fibroblast growth factor regulates expression of growth factors in rat epiphyseal chondrocytes. *J Orth Res*, 19:259-264.
- Shweiki D, Itin A.und Soffer D. 1992. Vascular endothelial growth factor induced by hypoxia may mediate hypoxia- initiated angiogenesis. *Nature*, 359:735- 745.
- Simms D, Cizdziel PE und Chomczynski P. 1993. *Focus*, 15 (4):99-101.
- Sledge S. 2001. Microfracture techniques in the treatment of osteochondral injuries. *Clin Sports Med*, 20:365-377.
- Smillie I. 1960. *Ostochondrosis dissecans*. Aufl. Edinburgh: Churchill Livingstone.
- Steadman J, Rodkey WG, Singleton SB und Briggs K. 1997. Microfracture technique for full thickness chondral defects: technique and clinical results. *Operat Tech Orthop*, 7:300-307.
- Tallheden T, Bengtsson C, Brantsing C, Sjogren -Jansson E, Carlsson L, Peterson L, Brittberg M und Lindahl A. 2005. Proliferation and differentiation potential of chondrocytes from osteoarthritic patients. *Arthritis Res Ther*, 7 (3):R560-568.
- Taylor D, Waggoner AS, Murphy RF, Lanni F und Birge RR. 1986. *Applications of Fluorescence in the Biochemical Science*. New York 3
- Till U. 1999. *Pathophysiologie/ Pathobiochemie systematisch*. Bremen: Uni-Med-Verlag.
- Urist M. 1965. Bone- formation by autoinduction. *Science* Nov12 150 (698):893-899.
- Urist M und Strates BS. 1971. Bone morphogenetic protein. *J Dent Res*, 50 (Suppl 6):1392-1406.
- Van den Berg W. 1995. Growth factors in experimental osteoarthritis: transforming growth factor- β pathogenic? *J Rheumatol*, 22:134-145.

- Van Denmark R. 1952. Osteochondritis dissecans with spontaneous healing. *J Bone and Joint Surg*, 34-A:143-148.
- Van Osch G, Buma P, van Beuningen HM, van den Berg WB und Veth R. 1998. Differential effects of IGF-1 and TGF- β 2 on the assembly of proteoglycans in pericellular and territorial matrix by cultured bovine articular chondrocytes. *Osteoarthritis Cart*, 6:187-95.
- Venbrocks R, Münzenberg KJ und Kempis VJ. 1988. Vergleich und Wertung konservativer und operativer Therapiemöglichkeiten bei Osteochondrosis dissecans des Kniegelenkes. *Z Orthop*, (126):30-33.
- Verschure P, Joosten LAB, van der Kraan PM und van den Berg WB. 1994. Responsiveness of articular cartilage from normal and inflamed mouse knee joints to various growth factors. *Ann Rheum Dis*, 53:455- 460.
- von der Mark K. 1986. Differentiation, modulation and dedifferentiation of chondrocytes. *Rheumatology*, Vol. 10:272-315
- von der Mark K, Kirsch A, Nerlich A, Kuss A, Wesseloh A, Gluckert K und Stoss H. 1992. Type X collagen synthesis in human osteoarthritic cartilage: indication of chondrocyte hypertrophy. *Arthritis Rheum*, 35:806-811.
- von der Mark K. 1999. Structure, Biosynthesis, and Gene Regulation of Collagens in Cartilage and Bone. In: Seibel M, Robins S, Bilezikian J, Hrsg. *Dynamics of Bone and Cartilage Metabolism*. New York: Academic Press, 3-29
- Vukicevic S, Luyten FP und Reddi H. 1989. Stimulation of expression of osteogenic and chondrogenic phenotypes in vitro by osteogenin. *Proc Natl Acad Sci USA*, 86:8793-8797.
- Wagner H. 1964. Operative Behandlung der Osteochondrosis dissecans des Kniegelenkes. *Z Orthop*, 98:333-335.
- Wang J und Aspenberg P. 1993. Basic fibroblast growth factor and bone induction in rats. *Acta Orthop Scand* 64 (5):557-561.
- Weiner F, Czaja MJ, Jefferson DM, Giambrone MA, Tur- Kaspas R, Reid LM und Zern MA. 1987. The effects of dexamethason on in vitro collagen gene expression. *JBiolChem*, 262:6955-6958.
- Weisser J, Riemer S, Schmidt M, Suva L, Poschl E, Bräuer R, und von der Mark K. 2002. Four distinct chondrocyte population in the fetal bovine growth plate: Highest Expression Levels of PTH/PTHrP Receptor, Indian Hedgehog, and MMP-13 in hypertrophic chondrocytes and their suppression by PTH (1-34) and PTHrP (1-40). *Exp Cell Res*, 279 (1):1-13.
- Wilfinger W, Mackey K und Chomczynski P. 1997. Effect of pH and ionic strength on the spectrophotometric assessment of nucleic acid purity. *BioTechniques*, 22:474.
- Wilson J. 1967. A diagnostic sign in osteochondritis dissecans of the knee. *J Bone and Joint Surg*, 49-A:477- 480.
- Wolf P. 1968. A new histochemical stain for neutrophilic leukocyte alkaline phosphatase. *Enzymologia*, 35:154-156.

- Wolf P, v.d.Muehl E und Praisler K. 1973. A test for bacterial Alkaline Phosphatase: Use in Rapid Identification of Serratia Organisms. Clin Chem, 19:1248.
- Wozney J und Rosen V. 1998. Bone morphogenetic protein and bone morphogenetic protein gene family in bone formation and repair. Clin Orth, 346:26-37.
- Zaleske D. 1997. Development of Components of the Skeletal System (Bone, Cartilage, Synovial Joints, Growth Plate). In: Dee R. Hrsg. Principles of orthopaedic practice. second edition. New York: McGrawHill, 3-14
- Zou H, Wiesner R, Massague J und Nieswander L. 1997. Distinct roles of type I bone morphogenetic protein receptors in the formation and differentiation of cartilage. Genes Dev, 11:2191-2203.

11. Anhang

11.1. Ehrenwörtliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass mir die Promotionsordnung der Medizinischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität bekannt ist,

ich die Dissertation selbst angefertigt habe und alle von mir benutzten Hilfsmittel, persönlichen Mitteilungen und Quellen in meiner Arbeit angegeben sind,

mich folgende Personen bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskripts unterstützt haben:

Univ.- Prof. Dr. med. R.- A. Venbrocks

Dr. rer. nat. Dr. med. habil. J. Mollenhauer

Dr. med. M. Aurich

J. Schömburg

C. Müller

Ch. Mollenhauer

Dr. phil. U. Floß

die Hilfe eines Promotionsberaters nicht in Anspruch genommen wurde und dass Dritte weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen von mir für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen,

dass ich die Dissertation noch nicht als Prüfungsarbeit für eine staatliche oder andere wissenschaftliche Prüfung eingereicht habe und

dass ich die gleiche, eine in wesentlichen Teilen ähnliche oder eine andere Abhandlung nicht bei einer anderen Hochschule als Dissertation eingereicht habe.

Jena, 27.03.2006

11. 2. Lebenslauf

von Mandy Seifert

geb. am 02.07.1979 in Schmalkalden

Schulbildung

1986- 1990	6. POS Erhard Schübel in Suhl / Thüringen
1990- 1991	9. POS Fritz Köhler in Suhl / Thüringen
1991- 1999	Prof.- Carl- Fiedler- Gymnasium in Suhl / Thüringen
1999	Abitur, allgemeine Hochschulreife

Hochschulstudium

1999- 2006	Studium der Humanmedizin an der Friedrich- Schiller- Universität- Jena
2000- 2003	Stipendiatin der Studienstiftung des Deutschen Volkes
2001	Ärztliche Vorprüfung
2002	Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
2005	Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
2005- 2006	Praktisches Jahr
Juni 2006	Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

11. 3. Danksagung

Für das Thema und die Anregung der vorliegenden Arbeit, die jederzeit hilfreiche und menschliche Unterstützung sowie für die intensive Betreuung während der Durchführung der Experimente, der Auswertung der Daten und des Verfassens dieser Arbeit gilt mein herzlichster Dank Herrn Dr. rer. nat. Dr. med. habil. Jürgen Mollenhauer (Prof., Biochemistry Rush University Chicago)

Besonderer Dank gebührt auch Herrn Univ.- Prof. Dr. med. R.- A. Venbrocks für die Möglichkeit der Dissertation an seiner Klinik sowie der hilfreichen Unterstützung und Betreuung.

Dr. med. Matthias Aurich danke ich für die einträgliche Zusammenarbeit an der Schnittstelle zwischen Operationssaal und Labor, sowie für das entgegengebrachte Vertrauen bei der Bearbeitung von humanen Zellen.

Ein ganz besonderes Dankeschön gilt den Laborantinnen der Abteilung, Jana Schömburg, Cordula Müller und Christine Mollenhauer für ihre zahlreichen praktischen Hilfestellungen im Labor sowie ihre freundschaftliche Unterstützung.

Für das unermüdliche Redigieren am Ende der Dissertationsarbeit und für die ermutigenden Konversationen möchte ich mich bei Herrn Dr. phil. Ulrich Floß bedanken.

Und am Ende möchte ich Ute, Elke, Sabine und Markus einen ganz besonderen Dank aussprechen, denn ohne ihre Unterstützung in den letzten Jahren wäre dieses Werk niemals zustande gekommen.